



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INDICADORES DE PARASITOSE INTERNA NO HEMOGRAMA DE AVES SELVAGENS

SUSANA CRISTINA MORGADO MENDES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria Teresa de Costa Mendes
Vitor Villa de Brito

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

CO-ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INDICADORES DE PARASITOSE INTERNA NO HEMOGRAMA DE AVES SELVAGENS

SUSANA CRISTINA MORGADO MENDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria Teresa de Costa Mendes
Vítor Villa de Brito

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

CO-ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

2018

LISBOA

A todos os que contribuíram para que me tornasse o
que sou hoje, que continuem a fazer parte desta
viagem.

“Nothing of me is original. I am the combined effort of
everyone I've ever known.”

— Chuck Palahniuk, *Invisible Monsters*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Doutor Luís Madeira de Carvalho, pela sua disponibilidade e ajuda ao longo da realização deste trabalho e pelo estímulo do estudo dos parasitas de vida silvestre, sempre com o seu humor alegre e distinto.

Ao meu coorientador, Dr. Fernando González pela paciência e amizade durante a minha estadia no GREFA. Pela partilha da sua experiência com animais selvagens, conhecimentos teóricos, práticos e da importância que tem uma equipa e os seus sorrisos.

Ao Prof. Telmo Nunes, pelo seu apoio no tratamento de dados e por me tranquilizar quando estava menos segura das minhas capacidades. Obrigada por ter sempre a porta aberta a qualquer aluno.

À Lídia Gomes pelo esclarecimento de dúvidas e pela paciência e porta aberta a quem aparece aleatoriamente no laboratório, cheia de questões existenciais.

Às Dras. Irene e Laura pela partilha diária, pelas reuniões matinais, pela amizade, pelos conhecimentos extensos e por me ensinarem que descansar não é motivo para vergonha.

À Carmen, Javi, Leyre, Susana e Tony pela paciência ao ensinar-me todas as técnicas de laboratório e pelo companheirismo nas noites tardias. Pela música partilhada, os recados e sorrisos no quadro branco.

Ao Nacho, Fernando Blanco, Isabel, Lorena, Carlos, Juanpa, Deborah e todas as outras incontáveis pessoas que fizeram com que me sentisse em casa no GREFA, sem hesitação na partilha de conhecimentos técnicos e apoio nas situações pessoais.

À Ana Larrañaga, Ana Heredia, Omar, Christian, Érica, Lourdes, Maria, Juan, Ele, Alejandro, Alba, Bea, Carlos, Clara, Elisa, Africa, Nerea, Jess, Alicia, Nata, Sérgio, Pablo, Judit e a todos os demais voluntários e estagiários que partilharam os dias de trabalho comigo. Também às pessoas que me apresentaram e se tornaram amigos preciosos e parte integrante da minha rotina, ao Vítor, Miquel, Alejandro e tantos outros. Trago comigo sempre cada viagem ao supermercado ao som de música altíssima, cada momento de relaxamento ao fim do dia de trabalho, todos os almoços e jantares, cada tarde e noite em Madrid, cada viagem à Serra por caminhos desconhecidos, cheios de neve e cheios de alegria, e aquela pedra em jeito de miradouro com vista sobre as luzes.

Ao Álvaro, por me ter ensinado tanto em tão pouco tempo. Obrigada por me fazeres subir uma montanha como se fosse a coisa mais natural do mundo consegui-lo. Obrigada pelas

conversas e por partilhares o teu amor à Natureza comigo. A marca que deixaste no mundo nunca será apagada, pois todos os que te conheceram te levam consigo. O teu sorriso perdura.

À equipa da Housevet por ter tido a paciência de me ensinar todas as bases desde o princípio e por ser a minha primeira “família” veterinária. Levo o que me ensinaram para a prática profissional, em qualquer espécie.

A toda a equipa do Lx-CRAS, Dr^a Manuela, Dr^a Inês, Dr^a Érica, Verónica, Nuno, Eva, Armando e Almor pelo companheirismo, amizade e partilha de conhecimentos desde 2016. Por ter sido uma casa onde cresci enquanto futura médica veterinária e enquanto pessoa.

A todos os voluntários do Lx-CRAS pelo apoio diário nas tarefas difíceis, fáceis, chatas e divertidas. Patrícia Almeida, Rita Pombo, Filipa Cardoso e todos os outros, não teria sido o mesmo sem vocês.

À Catarina, por ter tido a paciência de ler, examinar a fundo, corrigir sem medo e entender as incongruências neste trabalho e em mim. Fazes-me mais e mudaste tudo sem me tentar mudar. Quem não?

Ao Nuno Ramos por me ensinar Biologia e me deixar ensinar-lhe Veterinária. A partilha de conhecimentos evoluiu rapidamente para a partilha de parvoíces, de sorrisos, de vidas e tenho agora a certeza que ninguém nos tira um do outro enquanto vivermos. Partes deste trabalho vão sempre cheirar-me a Esteva e àquela janela de caravana no Alentejo.

À Inês Alves, fotógrafa incomparável, auxiliar maravilhosa, mulher de armas e companheira de aventuras e caretas. Obrigada pelas fotos que tiraste aos meus parasitas e a mim. Um maior obrigado por fazeres parte da minha vida e por todos os meses de partilha diária no Lx-CRAS.

Ao Panda e ao Kai, pela bolha mágica que é só nossa há tantos anos. Sei que independentemente do passar dos anos, teremos o Guincho. É um prazer ver-nos crescer.

À Sara e à Martina, pelas pérolas, pelas casas longe de casa e por me terem feito compreender a mim mesma e ao mundo tão melhor. Que as aventuras nunca acabem, e o chá também não!

Ao Wilson, por me ter tirado o medo de começar a escrever e me ter ensinado que há uma diferença gigante entre “*work hard*” e “*work smart*”. És indispensável.

Ao Miguel, amigo de demasiados anos e vizinho de demasiado poucos (ainda) com quem aprendi tanto sobre tantas coisas. Obrigada pela amizade e por, apesar de teres conhecido o pior e o melhor de mim, continuares a não ver diferença. Tem sido um prazer crescer contigo.

Ao meu padrinho João Pereira, por nunca ter deixado de ver o meu potencial mesmo quando eu própria não o encontrava. Pelo apoio ao longo dos anos, académico e pessoal, e sobretudo pela amizade.

Ao meu fenomenal afilhado Ricardo Lopes, de quem não poderia estar mais orgulhosa e que me ensinou tanto ou mais do que eu a ele.

Aos amigos com quem partilhei a viagem pelo mundo académico, à Margarida, Sónia, Ivo, Henrique, Melody, Mariana, Zé, Pedro e tantos outros. Tornaram os momentos divertidos melhores e os mais difíceis suportáveis. Foi um prazer estudar convosco e será sempre uma honra ser vossa colega.

À minha avó Coruja, por todos os anos de dedicação e amor. Por me ensinar a ser independente e polivalente, por ter sempre acreditado nas minhas capacidades e por todas as pequenas coisas que hoje sei fazer devido ao seu encorajamento. Não seria a pessoa que sou hoje sem ti, obrigada por tudo.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicionais. Pelo coração e a cabeça que me deram e fizeram crescer ao longo dos anos, e todas as oportunidades que tive graças ao vosso esforço. Levo em mim um pouco de ambos, sempre. Obrigada por acreditarem.

A todo o resto da minha família, o meu “Tio Grandão”, os meus deliciosos priminhos que mal posso esperar para ver crescer, a São e todos os tios, tias, e primas em graus desconhecidos, mas que não importa saber por não existir dúvida do vosso carinho.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e deixaram a sua marca. Mesmo aqueles casos em que a vida nos distanciou ou que por alguma razão já não fazem parte da minha, não seria quem sou hoje sem vocês. Levo comigo as lições e os sorrisos, o verdadeiramente importante.

Ao Indie e ao Toffee, diabretes deliciosos e pedinchões cheios de amor para dar, alunos assíduos das aulas da FMV nos primeiros meses de vida e companheiros de todos os dias. Também ao Fallafel, Tigre, Misty, Lucky, Goldie, Daisy, Alice e Lexie, que me relembram constantemente a razão porque fazemos o que fazemos.

Índice

1. Descrição das atividades de estágio	1
2. Revisão bibliográfica	4
2.1. Aves e a sua ecologia	4
2.2. Análises hematológicas.....	5
2.2.1. Método de colheita e armazenamento	6
2.2.2. Hemograma	8
2.2.3. Características hematológicas das aves	9
2.2.3.1. Eritrócitos	9
2.2.3.2. Leucócitos	11
2.2.3.3. Trombócitos	14
2.2.3.4. Rácio H/L	15
2.2.4. Alterações fisiológicas e patológicas hematológicas das aves	17
2.3. Análises parasitológicas.....	26
2.3.1. Hemoparasitas: <i>Leucocytozoon</i> , <i>Haemoproteus</i> e <i>Plasmodium</i>	26
2.3.1.1. Ciclo de vida	28
2.3.1.2. Método de distinção	30
2.3.1.3. Níveis de virulência	31
2.3.1.4. Sinais clínicos	32
2.3.2. Parasitas gastrointestinais	34
2.3.2.1. Apicomplexa (<i>Eimeria</i> , <i>Sarcocystis</i> e <i>Avispora</i>)	34
2.3.2.2. Helmintes	36
2.3.2.2.1. Tremátodes	37
2.3.2.2.2. Céstodes	38
2.3.2.2.3. Acanthocéfalos	39
2.3.2.2.4. Nemátodes	40
2.3.2.2.5. Diagnóstico de infecção	44
3. Desenvolvimento experimental	45
3.1. Objectivos	45
3.2. Material e métodos	45
3.2.1. Colheita, armazenamento e processamento de amostras	49
3.2.2. Análises hematológicas	51

3.2.3. Análises coprológicas	53
3.3. Análise estatística	55
4. Resultados e Discussão	57
4.1. Caracterização da população	57
4.2. Prevalências	58
4.3. Análise exploratória dos dados	68
5. Conclusão	77
6. Perspectivas e recomendações futuras	78
Referências bibliográficas	79
Anexos	94

Resumo

As aves e sua fauna parasitológica são excelentes indicadores do ecossistema, refletindo não só a saúde deste, mas de toda a cadeia alimentar. Um método para a avaliação do seu estado clínico é a hematologia, que revela o estado de saúde e resposta do indivíduo a vários fatores, sendo uma ferramenta importante na conservação de espécies silvestres.

Tendo por objetivo o estudo da fauna parasitológica interna das aves e da existência de relações entre os parâmetros hematológicos e o parasitismo, foram realizadas entre os meses de janeiro e maio de 2015, análises hematológicas e coprológicas em 40 aves ingressadas no *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA) em Madrid, Espanha, pertencentes a 19 espécies, posteriormente divididas em seis grupos funcionais.

Foi analisada a relação entre a ecologia das espécies analisadas, causa de ingresso dos indivíduos e a existência do parasitismo e respetivas características, bem como a relação entre as características referidas do parasitismo e alguns parâmetros hematológicos considerados relevantes.

A prevalência de infeção nas amostras fecais foi de 58,82%, tendo-se identificado *Capillaria* sp., *Synhimantus* sp., exemplares de Cestoda e Coccidia (*Sarcocystis* sp. e oocistos não esporulados). Nos esfregaços sanguíneos a prevalência foi de 23,3%, tendo-se identificado *Leucocytozoon* sp. e *Plasmodium* sp. Foi identificado poliparasitismo gastrointestinal e hemático em 20% da amostra. Este é também potencialmente o primeiro registo europeu de relação parasita-hospedeiro entre o género *Capillaria* sp. e as espécies *Circus aeruginosus* e *Falco columbarius*. As relações entre *Plasmodium* sp. e *Circus aeruginosus* e *Falco tinnunculus* são também potencialmente os primeiros registos, respetivamente, europeu e ibérico. Foram encontradas associações significativas entre o parasitismo e suas características, e as variáveis ecológicas, clínicas e hematológicas consideradas, nomeadamente o grupo funcional, a causa de ingresso e o valor relativo de linfócitos.

Estes resultados sugerem que a predisposição à parasitose depende dos hábitos ecológicos, estado hígido prévio do animal e interação entre parasitas. O presente estudo poderá servir de base para investigação futura deste tema, fornecendo mais dados de forma a facilitar a deteção e resposta adequadas a alterações no ecossistema.

Palavras-chave: Aves silvestres, Parasitismo interno, Características hematológicas, Hemoparasitas, Helminthes, Coccídeos, GREFA, Espanha.

Abstract

Birds and their parasites are excellent indicators of an ecosystem's status, reflecting not only its health but that of the whole food chain. Another method to study their condition is hematology, a tool which reveals an individual's status and response to various factors, being extremely important in wildlife conservation.

With the objective of studying the internal parasites of birds and the existence of associations between hematological parameters and parasitism, between the months of January and May 2015, hematological and coprological analysis were performed on 40 avian patients admitted to *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA) in Madrid, Spain, belonging to 19 species which were divided between six functional groups.

The relationship between the ecology of sampled species, cause for admission and presence of parasitism and its characteristics was analysed, as well as the relationships between these characteristics and a few hematological parameters considered relevant.

The prevalence of infection in fecal samples was 58,82%, in which *Capillaria* sp., *Synhimantus* sp., Cestoda and coccidial specimens were identified (*Sarcocystis* sp., and non-sporulated oocysts). In blood samples the prevalence was 23,3%, with *Leucocytozoon* sp. and *Plasmodium* sp. having been identified. Gastrointestinal and hematic polyparasitism was present in 20% of the sample. This is also a potential first report in Europe of a parasite-host relationship between *Capillaria* sp. and the species *Circus aeruginosus* and *Falco columbarius*. The relationship between *Plasmodium* sp. and *Circus aeruginosus* and *Falco tinnunculus* and also potential first records, respectively, in Europe and in the Iberian Peninsula.

Statistically significant associations were found between parasitism, its characteristics and the ecological, clinical and hematological variables considered, namely the functional group, cause of admission and relative leucocyte count.

These results suggest that the predisposition to parasitosis is dependent on the ecological habits of a species, health status of the individual and parasite interaction. The present study may serve as a basis to further investigation on this subject, supplying more data to ease detection and adequate response to changes in the ecosystem.

Key-words: Avian, Wildlife, Internal parasites, Hematological characteristics, Blood parasites, Helminths, Coccidea, GREFA, Spain.

Índice de figuras

Figura 1. <i>V.cutanea ulnaris superficialis</i> e <i>v. metatarsalis plantaris superficialis</i> ...	6
Figura 2. <i>V. jugularis dextra</i>	7
Figura 3. Linfócito e monócito de <i>T. alba</i>	12
Figura 4. Basófilo, heterófilo, eosinófilo e trombócitos de <i>T. alba</i>	14
Figura 5. Técnica de esfregaço por escorregamento ou “wedge smear technique”...	50
Figura 6. Leitura do hematócrito utilizando escala.....	51
Figura 7. - Câmara de Neubauer “Improved” e regra do "L".....	52
Figura 8. Oocisto de coccídea em <i>P. carbo</i>	59
Figura 9. <i>Sarcocystis</i> sp. em <i>A. otus</i>	60
Figura 10. Ovo de <i>Capillaria</i> sp. em <i>B. buteo</i>	60
Figura 11. Ovos e oncoesfera de Cestoda em <i>B. oedictnemus</i>	61
Figura 12. <i>Synhimantus</i> sp. em <i>A. otus</i>	61
Figura 13. <i>Leucocytozoon</i> sp. em <i>A. otus</i>	62
Figura 14. <i>Leucocytozoon</i> sp. em <i>S. aluco</i>	62
Figura 15. <i>Plasmodium</i> sp. em <i>F. tinnunculus</i>	63

Índice de tabelas

Tabela 1. Processos patológicos: variação dos parâmetros hematológicos.....	22
Tabela 2. Processos patológicos: achados nos parâmetros hematológicos.....	23
Tabela 3. Processos patológicos: morfologia atípica das linhas celulares.....	24
Tabela 4. Índice de policromasia.....	25
Tabela 5. Ecologia das espécies de aves.....	46
Tabela 6. Reagentes necessários à coloração Wright-Giemsa Modificada.....	50
Tabela 7. Casos de parasitose múltipla gastrointestinal.....	59
Tabela 8. Resultados da análise coprológica quantitativa.....	65
Tabela 9. Percentagem de valores relativos de linfócitos alterados: parasitose.....	74
Tabela 10. Percentagem de valores relativos de linfócitos alterados: localização....	74

Lista de abreviaturas e símbolos

GREFA - Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat

CRAS - Centros de recuperação de animais silvestres

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

CBC - Complete blood cell count

HT - Hematócrito

RBCc - Red blood cell count

WBCc - White blood cell count

Hb - Hemoglobin

RNA - Ribonucleic acid

MCV - Mean corpuscular volume

MCHC - Mean corpuscular hemoglobin concentration

MCH - Mean corpuscular hemoglobin

OPG - Ovos por grama de fezes

sp. – Espécie

spp. – Espécies

N/C - Rácio núcleo/citoplasma

H/L - Rácio heterófilos/linfócitos

TGI - Trato gastrointestinal

IP - Índice de policromasia

HD - Hospedeiros definitivos

HI - Hospedeiros intermediarios

HP - Hospedeiros paraténicos

IC - Intervalo de confiança

% - Percentagem

m - Metros

mm – Milímetros

µm - Micrómetros

h - Horas

g - Gramas

ml – Mililitros

1. Descrição das atividades de estágio

Os dados nos quais se baseia a presente dissertação de mestrado foram recolhidos ao longo de um estágio com duração de 5 meses no *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA), tendo a maior parte sido passada na área de medicina interna (internamento, enfermaria e laboratório).

O GREFA é uma organização não governamental, existente desde 1981, que se dedica à Recuperação, Reabilitação, Estudo e Conservação de espécies selvagens.

Conta com várias áreas dentro do centro, como o Hospital, a Reabilitação, o departamento de órfãos, a cria em cativeiro de algumas espécies, o resgate e Educação Ambiental. As atividades de estágio concentraram-se principalmente no Hospital e Laboratório, tendo passado semanalmente pela área de necropsias e brevemente pela reabilitação e órfãos. As atividades concretas desenvolvidas são de seguida sumariamente descritas.

No Hospital, após uma reunião matinal diária na qual eram revistos casos clínicos e planeada a organização do dia, os voluntários eram separados em equipas e as tarefas distribuídas, procedendo aos tratamentos dos animais internados (tanto nas Unidades de Cuidado Intensivo como no Reptilário e ocasionalmente, quando necessário, no departamento de Tartarugas Aquáticas e Reabilitação), bem como à receção de novos animais.

Os tratamentos diários incluíam a preparação e administração de medicação, bem como avaliação do estado geral dos animais (estado de hidratação, pesagem, exame de estado geral e evolução do quadro clínico). Além disso, dia a dia era realizada a monitorização e ajuste de alimentação, limpeza das instalações e tarefas de organização do centro.

Era feita também a preparação de medicação, envolvendo esta o cálculo diário das doses a administrar, consoante a pesagem do animal, bem como aplicação e ajuste de tabelas de reidratação e fármacos vários.

Quanto à administração de fármacos, a administração por via oral (com e sem o uso de sonda) era a mais utilizada, seguida da via parenteral; outros tratamentos consistiam na aplicação de pensos, ligaduras e apósitos, bem como vários outros tratamentos locais específicos aos casos.

Outra das funções dos voluntários era a receção de novos animais, aos quais era feito um exame físico objetivo de forma a chegar a um diagnóstico da causa de ingresso e necessidades terapêuticas, sob supervisão da equipa veterinária. Por vezes esta envolvia também a utilização de meios complementares de diagnóstico como a radiologia e as análises

hematológicas ou bioquímicas, entre outros. O tratamento era prescrito e administrado e a preparação das instalações e alimentação adequadas às necessidades do animal era feita.

Todas estas atividades contavam também com um registo rigoroso na base de dados de todas as intervenções realizadas, alimentação disponibilizada e consumida, comportamentos observados e evolução do quadro clínico, utilizando texto e fotografias.

Para além da rotina diária do internamento, foi dado apoio em situações pontuais, sendo exemplo das mesmas:

Revisão anual de estado geral dos Francelhos (*Falco naumanni*) do centro de cria em cativeiro, passando este por um exame físico completo, colheita de amostras de sangue e zaragatoas de cloaca e conjuntiva.

Preparação, e participação em intervenções cirúrgicas, envolvendo esta a preparação dos fármacos de emergência e material necessário à cirurgia, a anestesia do animal e preparação do campo cirúrgico. Enquanto voluntária, tive a oportunidade de participar em cirurgias variadas enquanto ajudante de cirurgião, ajudante de anestesista e circulante. Algumas intervenções às quais assisti foram: osteossíntese do úmero num Corvo-marinho-de-faces-brancas (*Phalacrocorax carbo*), correção de pododermatite de grau IV numa Águia de Bonelli (*Aquila fasciata*), colocação de sonda esofágica num Cágado-leproso (*Mauremys leprosa*), esofagostomia para remoção de corpo-estranho numa Cegonha-branca (*Ciconia ciconia*), e amputação de membro posterior de um Abutre-negro (*Aegypius monachus*) a nível do metatarso, entre outras.

Existiu ainda alguma colaboração pontual no tratamento fisioterapêutico de uma Coruja-das-torres (*Tyto alba*) com fibrose do patágio, tendo dentro desta área assistido à utilização de laser terapêutico.

Outros procedimentos clínicos interessantes foram a utilização de câmara térmica no diagnóstico de eletrocussões e outras alterações circulatórias, e a participação numa transfusão de sangue total num Corvo (*Corvus corax*).

Semanalmente participei na execução de necrópsias de acordo com o protocolo do centro, integrando-se nesta a recolha de amostras para diagnóstico de causa de morte, bem como para estudos e trabalhos científicos vários. Nestas era efetuado o registo fotográfico e textual rigoroso de tudo o que foi observado.

Uma das áreas onde foi dedicado mais tempo para além da enfermaria foi o laboratório clínico, já que a análise das amostras utilizadas para a elaboração desta dissertação de Mestrado foi maioritariamente efetuada pela autora, após um período de treino no laboratório. Além da análise das amostras destinadas à dissertação, foram também realizadas diariamente

as análises coprológicas e, quando necessário, as análises hematológicas e bioquímicas de animais internados no Hospital.

Dentro das análises hematológicas, as técnicas utilizadas foram a determinação do hematócrito, contagens totais de leucócitos e eritrócitos em Câmara de Neubauer Modificada, contagens diferenciais de leucócitos em esfregaço, contagens manuais estimadas de plaquetas e reticulócitos, e pesquisa e quantificação de hemoparasitas. Estas incluíam a preparação e coloração das amostras quando necessário.

As análises bioquímicas efetuadas foram essencialmente quantificações de chumbo, mas também glicémia, proteínas totais e bioquímicas gerais.

As análises coprológicas efetuadas passaram pela utilização de várias técnicas, sendo estas o exame directo, a flutuação, sedimentação e Ziehl-Neelsen – testes qualitativos; e a contagem em Câmara de MacMaster – teste quantitativo.

Durante a estadia no GREFA tivemos oportunidade de colaborar na organização de um curso de Ecocardiografia, tendo ajudado na preparação de material, coffee-breaks e apoio aos participantes durante o decorrer do curso. Foi possibilitada a assistência do evento ao mesmo tempo e participação nas sessões práticas quando esta não interferisse com a organização.

A permanência no GREFA permitiu observar o funcionamento e partes constituintes de um caso de sucesso na área, tendo voltado com uma melhor noção do que é necessário em termos estruturais, científicos e interpessoais para a recuperação e conservação de espécies selvagens. O resultado é a valorização renovada do trabalho em equipa, e uma melhor noção da variedade de indivíduos e áreas de especialidade necessárias para que um centro de recuperação de fauna selvagem funcione de forma organizada e eficiente, de forma a proporcionar a melhor chance de recuperação aos seus pacientes.

(Ver Anexo VIII – fotos de animais observados e amostrados durante o estágio).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Aves e a sua ecologia

A classe das Aves é de entre todas as classes de vertebrados a mais notória, melodiosa e, para muitos, a mais bela. Com mais de 9700 espécies espalhadas por quase todo o planeta, são a segunda classe mais numerosa de vertebrados, sendo apenas ultrapassada pela classe dos peixes. As suas adaptações são numerosas e variadas – algumas vivem em escuridão completa, utilizando ecolocalização para se orientarem; outras mergulham a profundidades superiores a 45 m para se alimentarem (Hickman, Roberts, Larson, L'Anson & David, 2006).

A característica singular que as distingue de outros animais são as suas penas. Além destas, existe uma grande uniformidade de morfologia entre aves pelo que, apesar de 150 milhões de anos de evolução terem levado a adaptação de cada espécie a um modo especializado de vida, é extremamente fácil reconhecê-las. Os seus membros anteriores encontram-se transformados em asas (se bem que nem sempre estas permitem o voo) e os posteriores adaptados a caminhar, nadar, empoleirar-se e, no caso das rapinas, caçar; todas possuem bicos queratinizados, cuja forma e tamanho se relacionam funcionalmente com a sua alimentação; e todas põem ovos. Esta uniformidade deve-se à evolução da capacidade de voo que restringiu grandemente a variação e diversidade morfológica, bastante mais evidente noutras classes de vertebrados (Madroño, González & Atienza, 2004; Hickman *et al.*, 2006).

Toda a anatomia das aves é desenhada em torno do voo: as suas asas precisam de ser adequadas a suportar e propulsionar; os ossos, apesar de leves, conferem uma estrutura rígida; o aparelho respiratório altamente eficiente para satisfazer as necessidades metabólicas intensas do voo e servir em simultâneo de mecanismo termorregulador, mantendo a temperatura constante; o aparelho digestivo deve ser rápido e eficiente de forma a processar uma dieta altamente energética; a taxa metabólica alta e o aparelho circulatório com pressão elevada. Acima de tudo, as aves necessitam de um sistema nervoso aperfeiçoado e sentidos apurados, nomeadamente a visão e a audição, especialmente importantes no caso das rapinas noturnas (Hickman *et al.*, 2006).

Recentemente, tem-se verificado um aumento do interesse pelo património natural e sua preservação na Península Ibérica, tendência que acompanha o verificado em todo o Mundo há vários anos. Dentro deste património, devido à sua ubiquidade, diversidade e facilidade de observação, as aves são um dos grupos que mais interesse suscita. Além deste interesse que atraem, são também autênticos indicadores do estado de conservação do seu habitat natural (Madroño *et al.*, 2004; Costa, de Juana Aranzana & Simó, 2011).

2.2. Análises hematológicas

A hematologia consiste no estudo do sangue e tecidos que lhe dão origem, sendo considerada parte integrante do diagnóstico clínico laboratorial em aves (Samour, 2006), não só domésticas como selvagens (Clark, Boardman, & Raidal, 2009; Campbell & Ellis, 2013) e relacionando-se com a fisiologia sanguínea, terapêutica e fisiopatologia de doenças variadas (Pendl & Samour 2009).

Trata-se de uma ferramenta indispensável pois, apesar de raramente fornecer um diagnóstico etiológico, revela o estado de saúde geral do animal, a evolução de quadros clínicos, a resposta à terapêutica (Samour, 2006) e contribui para a avaliação do prognóstico (Campbell & Ellis, 2013). No entanto, existe variabilidade interespecífica nos valores normais de qualquer parâmetro hematológico pela diversidade de espécies e adaptações evolutivas ao ambiente (Clark *et al.*, 2009), bem como uma enorme variabilidade intraespecífica, por fatores tanto intrínsecos como extrínsecos (Campbell & Ellis, 2013).

Alterações nas práticas de manejo ou no ambiente, por exemplo, podem afetar respostas fisiológicas, da mesma forma que o método de colheita, análise, transporte e armazenamento de amostras pode influenciar resultados (Fourie & Hattingh, 1980; Campbell & Ellis, 2013).

Quanto aos fatores intrínsecos existem variações fisiológicas dependentes do género, idade, estado reprodutivo, habitat, época do ano e dieta, que causam alterações nos parâmetros hematológicos (Fourie & Hattingh, 1980; Villegas *et al.*, 2004).

Nos últimos 15 anos, foram conseguidos avanços significativos na utilização de hematologia para diagnóstico diferencial de doença em aves. O processamento de amostras também foi melhorado face ao passado, em que o processamento automático estava limitado a contagens de eritrócitos (RBCC) totais (Samour, 2006).

Ainda que tenha sido conseguida uma melhor compreensão e rigor na técnica de citometria de fluxo, esta não produz resultados fiáveis em hematologia aviária (Samour, 2006). Os métodos manuais, mesmo consumindo mais tempo e sendo difíceis de integrar na rotina diária, são necessários. Apesar da dificuldade supramencionada, há que ter em conta que o envio de amostras para laboratório e seu processamento no mesmo são demorados e dispendiosos (Pendl, 2006).

O início atempado de terapêutica adequada é essencial para a recuperação do paciente e, portanto, a integração na rotina de técnicas simples de diagnóstico laboratorial é uma alternativa útil e pouco dispendiosa, sendo essencial para o seguimento de animais debilitados (Pendl, 2006).

2.2.1. Método de colheita e armazenamento

O volume total de sangue em aves saudáveis encontra-se entre os 6 e os 10% do seu peso vivo (Pendl & Samour, 2009; Sturkie, 2012). Têm uma maior tolerância a perdas de sangue que os mamíferos (Campbell, 1994; Lichtenberger, 2003), devido ao aumento da reabsorção de fluidos tissulares para repor a volémia e a estímulos de baroreceptores que promovem vasoconstrição mantendo a pressão arterial estável (Quesenberry & Hillyer, 1994). Assim, animais saudáveis podem perder até 10% do seu volume total de sangue sem sofrer riscos. O volume que pode ser colhido sem perigo para o paciente é cerca de 1% do seu peso vivo, dependendo do seu tamanho e estado hígido (Campbell, 1995).

O material utilizado deve ser adequado à espécie e volume de sangue a colher. A seringa deve ter o menor volume possível, de forma a evitar colapso do vaso por excesso de sucção, e a agulha deverá ter o maior diâmetro possível, para evitar alterações na estrutura e morfologia das células (Samour, 2006; Campbell, 2013).

Apesar de existirem várias técnicas de colheita, na maioria das espécies esta deve ser efetuada em zonas de aptério. Esta deve também ser realizada, se possível, com auxílio na contenção do animal, de forma a agilizar o processo e reduzir o stress a que o paciente é submetido (Dyer & Cervasio, 2008), sempre com o cuidado de não limitar o movimento da quilha (esterno), para que o animal possa respirar livremente. (Gosden, 2004; Campbell, 2013).

Em espécies de porte médio e grande, a colheita é geralmente efetuada por punção da veia ulnar cutânea (*v. cutanea ulnaris superficialis*), que cruza a superfície ventral da articulação úmero-radio-ulnar (cotovelo) sob a pele, devido ao seu fácil acesso e consequente diminuição de tempo de manipulação. Pode-se também utilizar a veia tibial caudal (*v. metatarsalis plantaris superficialis*), no lado medial do tibiotarso, acima da articulação do tarso. Esta encontra-se protegida pelos músculos da perna, reduzindo a sua mobilidade e formação de hematomas (Campbell, 1995; Samour, 2006; Krautwald-Junghanns, 2007).

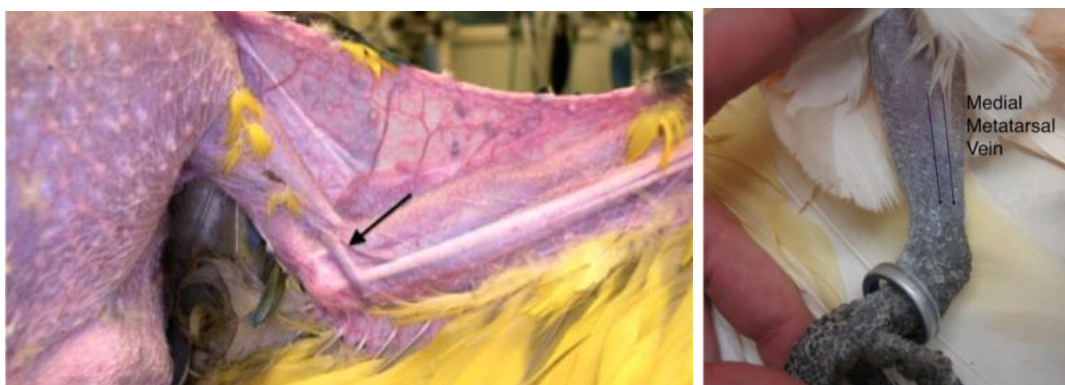


Figura 1 – *V. cutanea ulnaris superficialis* (seta) e *v. metatarsalis plantaris superficialis* (linhas) (Cital, Lennox & Goodnight, 2016).

Em espécies de menor porte (peso inferior a 500g) a colheita de sangue é difícil de fazer com auxílio de um assistente, devido ao seu reduzido tamanho (Dyer & Cervasio, 2008). Os locais de colheita mencionados no parágrafo anterior têm, nestas espécies, um calibre muito reduzido, o que facilita a formação de hematomas (Campbell, 1995) que podem, em animais de porte muito pequeno (menos de 60g), corresponder a uma perda de sangue suficiente para levar a anemia ou mesmo morte (Echols, 1999; Brown, 2007).

Assim, a colheita é geralmente feita na veia jugular direita (*v. jugularis dextra*), cujo diâmetro é geralmente superior ao da veia jugular esquerda (Samour, 2006; Campbell, 2013). Além da veia jugular, existem outras técnicas, como o corte de unhas (pouco aconselhado, já que esta técnica afeta a distribuição e conteúdo celular), punções cardíaca e do seio occipital (somente aconselhadas em animais sob anestesia ou durante a necrópsia) e punção cutânea sobre o vaso (Samour, 2006; Krautwald-Junghanns, 2007; Campbell, 1995, 2013).



Figura 2 – *V. jugularis dextra* (Cital *et al.*, 2016).

Após a colheita de sangue e remoção da agulha (para evitar destruição ou alteração morfológica de células), este deve ser rapidamente introduzido num tubo de colheita (Samour, 2006). Geralmente as seringas utilizadas não contêm anticoagulante. Todavia, em animais de porte muito pequeno, devido ao risco de coagulação da amostra com o passar do tempo, a colheita pode ser feita para uma seringa contendo anticoagulante ou diretamente com uma agulha - deixando o sangue fluir para um frasco com anticoagulante (Campbell, 2013).

Nas amostras destinadas ao hemograma, o anticoagulante mais utilizado é o EDTA, já que em amostras heparinizadas não é possível estimar o fibrinogénio ou efetuar contagens de leucócitos e trombócitos corretamente, devido a aglomeração dos mesmos e alterações na sua coloração (Samour, 2006; Krautwald-Junghanns, 2007). No entanto, existem exceções: é recomendado o uso de tubos heparinizados em espécies nas quais a utilização de EDTA causa hemólise eritrocitária progressiva. Alguns exemplos destas espécies são membros das famílias Corvidae (como Pega-rabuda, *Pica pica*, Corvo, *Corvus corax*, e Gralha-de-nuca-cinzenta, *Corvus monedula*), Gruidae (Grou-coroado-oriental, *Balearica regulorum* e Grou-coroado, *B.*

pavonina), Megapodiidae (Peru-do-mato, *Alectura lathamii*), Halcyonidae (Cucaburra, *Dacelo novaeguineae*), Cracidae (Mutum-poranga, *Crax alector*), Bucerotidae (Calau-coroadado, *Tockus alboterminatus*), Strigiidae (Bufo-real, *Bubo bubo*) e Struthionidae (Avestruz, *Struthio camelus*) (Hawkey & Samour, 1988; Campbell, 1994; Krautwald-Junghanns, 2007; Guzman *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2009).

Após a colheita, é necessário estabelecer prioridades na utilização do sangue. Uma parte essencial do exame hematológico, como método rápido e com baixos custos associados, é a realização do esfregaço sanguíneo. Requer uma quantidade muito pequena de amostra, sendo por isso o primeiro a ser efetuado. De seguida, preenche-se um tubo de microhematócrito. Este exame dá-nos informação importante sobre o estado do paciente, permitindo observar a coloração do plasma, entre outros fatores. Por último, armazena-se a amostra em tubo contendo um anticoagulante adequado à espécie, geralmente para contagens totais de leucócitos e eritrócitos (Campbell, 1995; Samour, 2006).

É também possível efetuar um esfregaço a partir de sangue em EDTA pelo que as prioridades podem ser ajustadas em função deste facto. Há que ter em conta, neste caso, que a exposição prolongada de sangue ao EDTA pode causar artefactos e, portanto, o esfregaço deve ser feito o mais cedo possível (Campbell, 1995).

Quanto à realização do esfregaço, como referido anteriormente, deve ser feita utilizando uma gota de sangue total fresco sem anticoagulante ou com EDTA (Campbell, 2013; Krautwald-Junghanns, 2007). Alguns autores descrevem o uso de albumina bovina para minimizar a lesão celular, quer pela mistura de 5 gotas de sangue com 1 gota de albumina a 22% (Guzman *et al.*, 2008), quer pela mistura de quantidades iguais de sangue e albumina purificada (Campbell, 2013).

2.2.2. Hemograma

O hemograma (*Complete Blood Cell count* - CBCc) é um dos testes mais importantes na determinação do estado de saúde em aves. Nenhum outro teste revela a mesma quantidade de informação. Consiste num conjunto de provas hematológicas designadas para a análise das células sanguíneas na circulação periférica, das quais fazem parte uma avaliação eritrocitária, leucocitária e trombocitária (Harris, 2009; Pendl & Samour, 2009; Doneley, 2016).

Na primeira, é feita uma avaliação dos eritrócitos através da determinação de vários parâmetros, entre eles o hematócrito (HT), a contagem total de eritrócitos (*Red Blood Cell count* - RBCc), a concentração de hemoglobina (Hb), a avaliação da morfologia eritrocitária e a contagem de reticulócitos. Na segunda, avaliam-se os leucócitos através da contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos e da avaliação de morfologia leucocitária.

Por último, quando possível, avaliam-se os trombócitos efetuando uma contagem total dos mesmos (Campbell, 1995; Doneley, 2016). Alguns autores consideram ainda como parte do hemograma a pesquisa de hemoparasitas no sangue (Harris, 2009).

2.2.3. Características hematológicas das aves

Existem diferenças entre o sangue de mamífero e o de ave, mas uma vez reconhecidas, a semelhança de funções dos vários componentes torna-se evidente. De forma idêntica aos mamíferos, o sangue das aves contém eritrócitos, leucócitos e trombócitos. A diferença encontra-se no facto de todas estas linhas celulares reterem o seu núcleo durante toda a vida, bem como no tempo inferior de semivida das células maduras (cerca de 20 a 35 dias nas aves comparados aos 120 dias nos mamíferos). Os tipos de leucócitos são semelhantes aos que ocorrem em mamíferos (exceto lagomorfos) excetuando os heterófilos que substituem, nas aves, os neutrófilos. Além disto, os trombócitos nucleados substituem as plaquetas (Harris, 2009; Pendl & Samour, 2009; Doneley, 2016).

2.2.3.1. Eritrócitos

Os eritrócitos maduros das aves são geralmente maiores que os de mamífero, mas de tamanho inferior aos de anfíbios e répteis. Contudo, este tamanho varia consoante a espécie. De forma geral, o seu tamanho varia entre $10,7 \times 6,1 \mu\text{m}$ e $15,8 \times 10,2 \mu\text{m}$ (Sturkie, 2012; Campbell, 2015).

São células elípticas e achatadas, com um núcleo também elíptico e central, menos deformáveis e com uma maior concentração de hemoglobina livre citoplasmática, relativamente às suas homólogas nos mamíferos. A cromatina nuclear encontra-se aglomerada uniformemente e torna-se gradualmente mais condensada com o envelhecer da célula. O citoplasma tinge, tipicamente, com uma cor laranja a rosa e o núcleo com um tom violáceo, pela coloração de Wright (Pendl & Samour, 2009; Samour, 2009; Campbell, 2015).

No esfregaço podem encontrar-se, para além dos típicos eritrócitos maduros, células representantes de estágios diferentes do seu desenvolvimento. Exemplo disso são os reticulócitos, a penúltima célula na cadeia de maturação dos eritrócitos. Tendem a ser maiores que as células maduras, com um núcleo cuja cromatina está menos condensada. Contém agregados granulares de RNA, que coram com azul de metileno em coloração supravital, em torno do núcleo. Em aves de rapina e psitacídeos adultos saudáveis, representam menos de 10% da contagem total de eritrócitos, sendo o seu valor variável consoante a espécie (Campbell, 1995). São células que entraram na circulação periférica há pouco tempo e refletem a resposta regenerativa atual, o que lhes confere um importante papel diagnóstico (ver Tabela 4).

Outras formas imaturas de eritrócitos são os rubricitos, células tipicamente mais pequenas e com um rácio núcleo/citoplasma superior às formas maduras. O seu citoplasma é escasso e marcadamente basofílico (Krautwald-Junghanns, 2007; Clark *et al.*, 2009; Pendl & Samour, 2009; Sturkie, 2012; Campbell, 2015).

As aves respondem à perda de sangue, como foi antes referido, de forma diferente dos mamíferos. A eritropoietina aviária, uma glicoproteína produzida no rim, atua diretamente na medula óssea aumentando a taxa de produção de eritrócitos. Apesar da eritropoiese também ser estimulada pela eritropoietina, esta é diferente da dos mamíferos (Campbell, 2015).

Foi demonstrado que a inoculação de soro de aves anémicas ou anóxicas estimula a eritropoiese em outras aves, mas não em mamíferos. De forma semelhante, soro humano não estimula a eritropoiese em aves. Sabe-se que a eritropoietina dos mamíferos requer uma estrutura proteica intacta e ácido siálico para ter atividade biológica. No caso das aves, a eritropoietina não é inativada após digestão por sialidase. Assim, é aparente que a estimulação da eritropoietina em aves e mamíferos é induzida pelas mesmas condições, mas mediada por diferentes fatores humorais proteicos (Rosse & Waldmann, 1936; Campbell, 2015).

A hemoglobina aviária é muito semelhante à dos mamíferos na medida em que se trata de uma proteína tetramérica contendo 4 subunidades proteicas, que por sua vez se encontram associadas a unidades heme contendo ferro, apesar de as suas frações proteicas (globulinas) diferirem (Scanes, 2014; Campbell, 2015).

Como foi já referido, existem vários parâmetros de avaliação dos eritrócitos.

O hematócrito (HT) é um teste hematológico extremamente importante pois, de forma simples e objetiva, permite-nos saber a proporção do volume que, no sangue total centrifugado, corresponde aos eritrócitos. É também essencial para o cálculo do Volume Corpuscular Médio (*Medium Corpuscular Volume* - MCV) e da Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular (*Medium Corpuscular Haemoglobin Concentration* - MCHC) (Samour, 2009).

Na maioria das aves este valor encontra-se entre os 35 e os 55%, sendo valores inferiores indicadores de anemia e superiores indicadores de desidratação (Campbell, 1995) ou policitémia (Campbell & Ellis, 2013).

O RBCc permite-nos calcular a concentração de eritrócitos no sangue periférico, importante para a avaliação de estado geral e essencial para o cálculo do MCV e da Hemoglobina Corpuscular Média (*Medium Corpuscular Haemoglobin* - MCH) (Samour, 2009). O seu valor varia muito, sendo influenciado por fatores tais como a espécie, idade, sexo, condição hormonal, e ambiente (Campbell, 1995).

Outro parâmetro utilizado na avaliação eritrocitária de aves é a concentração estimada de hemoglobina. A determinação desta é dificultada pela presença de núcleos nos eritrócitos e pode ser calculada por métodos manuais ou automáticos (Samour, 2009). Em aves saudáveis de várias espécies, este valor corresponde a um terço do volume de eritrócitos, podendo estimar-se dividindo o HT por 3 (Campbell, 1995).

Na avaliação eritrocitária avalia-se também a morfologia celular, de forma a verificar se ocorre, por exemplo, policromasia excessiva, reticulocitose (aumento da proporção de eritrócitos jovens), anisocitose (variação do tamanho dos eritrócitos) ou poiquilocitose (variação da forma dos eritrócitos). Frequentemente encontra-se no sangue periférico de animais adultos saudáveis alguma regeneração eritrocitária. As células imaturas (policromáticas) encontradas são geralmente reticulócitos (Doneley, 2016).

As alterações fisiológicas e patológicas (ver Tabelas 1, 2, 3 e 4) a estes parâmetros serão discutidas após descrição de todas as linhas celulares.

2.2.3.2. *Leucócitos*

Uma interpretação correta de contagens de leucócitos depende da identificação e diferenciação precisa dos mesmos em esfregaço. A leucopoiese em aves é semelhante à dos mamíferos, na medida em que estes apenas entram em circulação no sangue periférico quando estão maduros (Clark *et al.*, 2009; Campbell & Ellis, 2013).

Os leucócitos aviários dividem-se em agranulócitos ou células mononucleares (linfócitos e monócitos) e granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) (Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015; Doneley, 2016). A contagem total (WBCc), a contagem estimada e a contagem diferencial de leucócitos, efetuadas por métodos manuais ou automáticos, são usados para avaliação leucocitária no hemograma (Jones, 2015).

A granulopoiese em aves parece seguir estádios semelhantes à dos mamíferos (mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito e granulócito), mas enquanto a medula óssea continua a ser o local primário da mesma, outros órgãos com o baço, fígado, rim, pulmão, timo, gónadas e pâncreas podem estar envolvidos. Já a linfopoiese ocorre na Bolsa de Fabricius, timo e baço, tendo três estádios: linfoblasto, prolinfócito e linfócito (Pendl & Samour, 2009; Doneley, 2016).

Os linfócitos de ave assemelham-se aos seus homólogos mamíferos, tipicamente redondos com irregularidade citoplasmática já que se moldam em torno de eritrócitos adjacentes no esfregaço. Têm um núcleo redondo, ligeiramente indentado e central (ou ligeiramente desviado do centro), cuja cromatina é muito aglomerada em células adultas. O citoplasma é homogéneo, escasso (o que confere a estas células um rácio de núcleo para

citoplasma muito elevado) e ligeiramente basofílico sem nenhuns grânulos ou vacúolos (Clark *et al.*, 2009; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015).

Os linfócitos constituem o segundo tipo celular mais frequente, exceto em *Amazona* spp. e algumas espécies de passeriformes (por exemplo o canário doméstico, *Serinus canaria domestica*) nos quais são predominantes, chegando a perfazer 70% dos leucócitos circulantes (Jones, 2015).

São geralmente divididos em pequenos, médios e grandes, sendo os primeiros dois mais comuns no sangue periférico. Estes podem confundir-se com trombócitos, cuja identificação será abordada mais à frente. Podem-se também caracterizar como reativos, que são médios ou grandes com a cromatina muito aglomerada, citoplasma fortemente basofílico e vacúolos citoplasmáticos. Os linfócitos reativos podem estar presentes em esfregaços de sangue periférico em número reduzido, mas quando este aumenta indicam estimulação antigénica por agentes infecciosos. Linfócitos grandes com a cromatina dispersa, nucléolos e citoplasma abundante fortemente basofílico com uma região pálida perinuclear, podem ser neoplásicos (Clark *et al.*, 2009; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015). As implicações clínicas das concentrações de vários tipos de leucócitos serão abordadas em detalhe posteriormente.

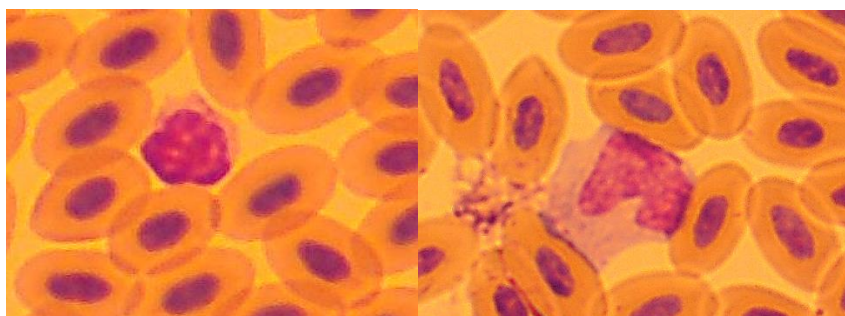


Figura 3 – Linfócito (esquerda) e monócito (direita) de *T. alba* (esfregaço, ampliação de 1000x).

Os monócitos são o maior leucócito presente no esfregaço sanguíneo de aves, sendo semelhantes aos encontrados em mamíferos (Krautwald-Jughanns, 2007; Campbell & Ellis, 2013; Doneley, 2016). Têm uma forma redonda ou amebóide, com um núcleo cuja forma é variável (redondo a alongado, mas geralmente indentado ou mesmo bilobado) e um citoplasma azul-acinzentado com vacúolos ocasionais e grânulos eosinofílicos pequenos. São células fagocíticas e encontram-se na circulação periférica por um curto período de tempo, após o qual migram para os tecidos onde são transformados em macrófagos. Uma vez que são pouco frequentes no sangue periférico, contagens reduzidas ou nulas não são incomuns (Campbell, 1995; Jones, 2015; Doneley, 2016). Tanto os monócitos como os macrófagos possuem químicos biologicamente ativos, envolvidos na mediação da inflamação e destruição de organismos invasores. Têm também um papel imunológico importante no processamento de antígenos (Pendl & Samour, 2009; Campbell & Ellis, 2013).

Os heterófilos são os leucócitos mais frequentes no sangue periférico da maioria das aves, com exceção das espécies linfocitárias anteriormente descritas. Equivalem em função, nas aves, aos neutrófilos, apesar de diferirem grandemente na sua morfologia. São células arredondadas com um núcleo polimórfico (bi- ou trilobado em células maduras) cuja cromatina basofílica se agrega grosseiramente. Têm um citoplasma transparente com grânulos eosinofílicos em forma de bastonete, que podem ser redondos consoante a espécie e possuem um corpo central distinto de aparência birrefringente podendo cobrir parcialmente o núcleo da célula (Campbell, 1995; Pendl & Samour, 2009; Samour, 2009; Jones, 2015; Doneley, 2016).

São células altamente móveis, fagocíticas e têm um papel importante nos mecanismos de defesa do corpo, sendo capazes de responder a um estímulo quimiotático em 30 minutos. O seu número aumenta rapidamente em situações de stress moderado, permitindo a utilização do rácio heterófilos/linfócitos (H/L) (abordado posteriormente) como indicador de stress. Em situações de stress muito elevado, no entanto, o seu número diminui (Limiñana, 2009; Doneley, 2016).

Podem ainda ser observados exemplares imaturos destas células, caracterizados por terem um núcleo em banda com lobulações mal definidas ou em forma de ferradura. O seu citoplasma é basofílico com menos grânulos que as células adultas, sendo estes grânulos redondos e também fortemente basofílicos. São facilmente confundidos com basófilos.

Além das células imaturas, podem observar-se heterófilos tóxicos, caracterizados por uma basofilia citoplasmática aumentada, vacuolização do citoplasma, hipersegmentação e degeneração do núcleo, desgranulação (ou formas anormais dos grânulos) e inclusões citoplasmáticas basofílicas (Tabela 4; Pendl & Samour, 2009; Jones, 2015; Doneley, 2016).

Os eosinófilos são células redondas, com um citoplasma ligeiramente basofílico (contrastando com o citoplasma transparente dos heterófilos). Apesar do seu tamanho ser semelhante aos heterófilos não deixa de existir uma moderada variação interespecífica. Tendem a ser mais irregulares na sua forma e os seus grânulos são geralmente redondos e distintamente eosinofílicos, ainda que a forma e cor variem entre espécies. O núcleo é lobado, com a cromatina basofílica aglomerada e tanto os grânulos como o núcleo coram mais que os dos heterófilos. O corpo central birrefringente presente nos heterófilos encontra-se ausente nos eosinófilos (Campbell, 1995; Pendl & Samour, 2009; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015; Doneley, 2016).

O estudo ultraestrutural destas células revela que os grânulos contêm concentrações elevadas de arginina (responsável pela sua coloração forte) e enzimas como a peroxidase, fosfatase ácida, e arilsulfatase (Campbell, 1995; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015).

A sua função é ainda pouco conhecida uma vez que a eosinofilia em aves é rara e, apesar de por vezes associada a infeções parasitárias, pode não ser indicativa de parasitismo, contrariamente ao que sucede nos mamíferos. Os seus números também podem aumentar em caso de lesões em tecidos moles. A eosinofilia é geralmente relativa, na medida em que se pode tratar de um aumento na percentagem de eosinófilos, mas não uma alteração no número absoluto de eosinófilos circulantes. Alguns autores atribuem a eosinofilia a uma reação de hipersensibilidade retardada (Krautwald-Junghanns, 2007; Pendl & Samour, 2009; Jones, 2015; Doneley, 2016).

Os basófilos são células muito incomuns no esfregaço de sangue periférico de aves, não devendo ser confundidos com heterófilos tóxicos ou imaturos. São pequenos e redondos, com citoplasma transparente e um núcleo redondo central, azul claro. O citoplasma contém vários e numerosos grânulos esféricos, intensamente basofílicos, que muitas vezes se sobrepõe ao núcleo e o mascaram. Os grânulos podem dissolver-se ou coalescer em coloração de Wright, ou qualquer outra solubilizada por álcool (Campbell, 1995; Samour, 2009; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015; Doneley, 2016).

Em aves, têm uma função importante em reações inflamatórias precoces e reações imediatas de hipersensibilidade, diferindo dos mamíferos na medida em que não contribuem para reações de hipersensibilidade retardada. É reportada basofilia em casos de doença respiratória, clamidiose e trauma tissular com mais de 48h. Acredita-se também que estão envolvidos na resposta imunitária a neoplasias com necrose tissular significativa. É comum que não se identifique nenhum num hemograma normal (Krautwald-Junghanns, 2007; Pendl & Samour, 2009; Jones, 2015; Doneley, 2016).

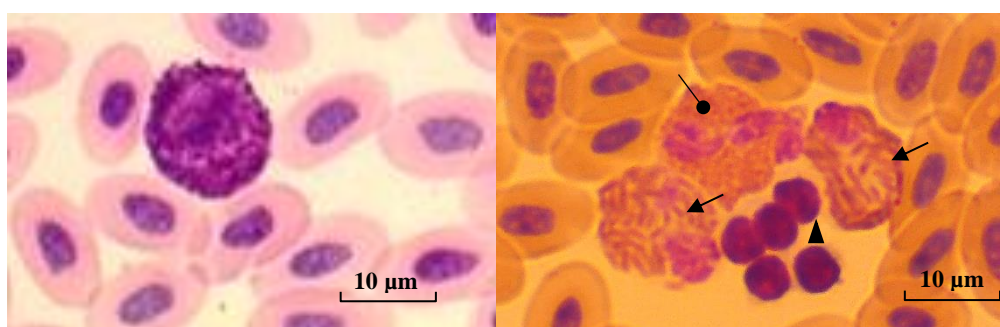


Figura 4 – Basófilo (esquerda); direita - heterófilo (seta), eosinófilo (círculo) e trombócitos (triângulo) de *T. alba* (esfregaço, ampliação de 1000x).

2.2.3.3. *Trombócitos*

Os trombócitos são homólogos às plaquetas dos mamíferos. São células pequenas, ovais ou redondas, distinguíveis dos eritrócitos pelo tamanho (são mais pequenos) e pelo rácio núcleo/citoplasma (N/C) alto e núcleo mais redondo e escuro que o dos eritrócitos. A cromatina nuclear é densa e fortemente basofílica e o citoplasma é transparente, azul claro ou

cinzento pálido. Geralmente parecem vacuolizados, com uma ou duas inclusões basofílicas nos polos celulares. Os trombócitos aviários têm a sua origem em células estaminais, contrastando com as plaquetas dos mamíferos que têm origem em megacariócitos (Campbell, 1995; Krautwald-Junghanns, 2007; Samour, 2009; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015; Doneley, 2016).

A sua função não é completamente clara, porém sabe-se que participam na hemostase (agregando-se no local da lesão vascular) e são também consideradas fagocitárias, ajudando à remoção de material estranho do sangue. Não possuem muita tromboplastina, por isso é improvável que iniciem a coagulação (Campbell, 1995; Pendl & Samour, 2009; Jones, 2015; Doneley, 2016).

Contagens de trombócitos não são feitas comumente, mas ao invés, classificam-se como adequadas, aumentadas ou diminuídas. Em infecções bacterianas o seu número aumenta, ocorre a sua ativação (vacuolização e formação de pseudópodes) e tendem a agregar-se. A trombocitose, apesar de não estar bem documentada, pode ocorrer em resposta a trombocitopénia ou doenças inflamatórias crónicas. Pode também ocorrer quando há muita destruição ou necessidade excessiva de plaquetas, como em casos de septicémia, coagulação intravascular disseminada, supressão da medula (pancitopénia) e doenças virais (Campbell, 1995; Pendl & Samour, 2009; Campbell & Ellis, 2013; Jones, 2015; Doneley, 2016).

2.2.3.4. *Rácio H/L*

O rácio de heterófilos e linfócitos é utilizado como ferramenta para monitorizar a função imunitária em aves. Nas espécies aviárias os heterófilos, monócitos e trombócitos são células fagocíticas. Destes, o primeiro a acumular-se no tecido afetado durante uma resposta aguda inflamatória (tanto a fatores infecciosos como não infecciosos), são os heterófilos. Desde que foi descrita pela primeira vez uma diminuição no número de linfócitos e um aumento no número de heterófilos em resposta a fatores de stress fisiológicos (Gross & Siegel, 1983) a relação entre estes dois leucócitos passou a ser considerada um indicador de stress em aves domésticas, mais fiável que os corticosteróides plasmáticos e menos variável que os valores absolutos de cada tipo celular (Lentfer *et al.*, 2015).

Este rácio é pouco dispendioso, fácil de obter a partir de um esfregaço sanguíneo e revela informação importante sobre o estado de saúde do paciente, permitindo avaliar o seu stress e classificar a espécie em linfocítica ou granulocítica (Campbell, 1995; Vleck *et al.*, 2000).

Como foi mencionado anteriormente, o número de heterófilos pode aumentar consideravelmente quando o animal é exposto a fatores indutores de stress ligeiro a

moderado. Por outro lado, animais com valores altos de linfócitos no seu leucograma normal tendem a desenvolver leucopénia e linfopénia na sua resposta inicial ao stress, apesar de desenvolverem a leucocitose e heterofilia típicas das restantes espécies até 12 horas mais tarde (Gross & Siegel, 1983; Campbell, 1995; Davis, Maney & Maerz, 2008).

Animais com um número de heterófilos superior ao de linfócitos no leucograma normal tendem a sofrer alterações menos drásticas deste rácio na resposta inicial ao stress. O rácio de heterófilos para linfócitos é menos variável que as contagens totais; e o intervalo de valores deste rácio é maior que os intervalos para heterófilos e linfócitos, dentro de grupos experimentais e de controlo (Gross & Siegel, 1983; Campbell, 1995; Vleck *et al.*, 2000).

Existe, ainda, uma relação linear comprovada experimentalmente entre a administração de corticosteróides per os e o logaritmo do rácio H/L. De acordo com os autores do estudo em causa, este poderá ser um melhor indicador que a concentração plasmática de corticosteróides, especialmente quando se tratam de casos de stress crónico, pois este rácio mede uma alteração fisiológica, enquanto a concentração de corticosteróides é afetada por vários fatores antes de ocorrerem alterações fisiológicas. Portanto, o rácio H/L é uma medida mais adequada a alterações ambientais a longo prazo que a concentração de corticosteróides, mais adequada a alterações a curto prazo (Gross & Siegel, 1983; Lentfer *et al.*, 2015; Vleck *et al.*, 2000).

Isto deve-se ao facto de fatores indutores de stress, como a privação de água ou comida, alteração das estruturas sociais, excesso de luz e temperaturas extremas, causarem um aumento do número de heterófilos e a diminuição do número de linfócitos. No entanto, ainda não está estudado sistematicamente o impacto dos fatores espécie, sexo, época reprodutiva e ambiente no valor de H/L. (Gross & Siegel, 1983; Vleck *et al.*, 2000; Campo & Davila, 2002; Blas, 2006; Davis *et al.*, 2008).

Por exemplo, num estudo efetuado em gaivotas (*Larus spp.*) o rácio era 0,6 em animais saudáveis, subindo para 2,9 em animais oleados, emaciados, com endoparasitas ou magoados. Em Peneireiros-comuns (*F. tinnunculus*), encontrou-se uma melhor correlação dos fatores ambientais com o rácio H/L comparativamente ao corticosteróide plasmático. Concluiu-se, também, que o rácio H/L respondia mais sensivelmente a fatores subtis, enquanto o H/L e o corticosteroide reagiam em situações graves (como a fome, em animais selvagens) (Campo & Davila, 2002; Muller, Eiermann & Jenni, 2011).

Nestes casos, o rácio heterófilo/linfócito pode ser utilizado como indicador de stress, sendo obtido pela divisão do número de heterófilos pelo de linfócitos. Apesar de, na sua generalidade, um aumento do valor H/L corresponder a um aumento no stress, sabemos que existem outros fatores que o influenciam, apesar de se encontrarem pouco estudados. (Campo & Davila, 2002; Davis *et al.*, 2008; Campbell & Ellis, 2013; Doneley, 2016).

A interpretação de qualquer variável imunológica, como o rácio H/L, para medida de stress é difícil pois inúmeros fatores fisiológicos e comportamentais interagem de forma a influenciar a imunidade do hospedeiro e assim, para atribuir significado às variações do rácio, há que entender as variações de linfócitos e heterófilos, que serão mencionadas de seguida (Lentfer *et al.*, 2015).

2.2.4. Alterações fisiológicas e patológicas nas características hematológicas das aves

Um parâmetro diagnóstico representa uma característica mensurável de um sistema metabólico particular, passível de ser usada para avaliar o estado atual desse sistema. Vários fatores são necessários para obter resultados clinicamente úteis: o sistema em questão tem que se encontrar bem definido e distinto de outros sistemas; o parâmetro tem que representar uma parte específica do sistema e a sua medição tem que revelar também alterações mínimas ao sistema; e o teste em questão tem que ser capaz de identificar os verdadeiros positivos (especificidade) e os verdadeiros negativos (sensibilidade) com precisão (Lentfer *et al.*, 2015).

Existem mais de 9700 espécies de ave, vastamente diferentes no que toca à sua anatomia, fisiologia, forma e função. Os seus hábitos alimentares variam, existindo aves carnívoras, nectívoras, granívoras e omnívoras. Naturalmente, todas estas espécies não se encontram conformadas a um mesmo intervalo de valores (Doneley, 2016).

Para ser possível reconhecer a resposta hematológica à doença, é necessário conhecer e ser capaz de reconhecer as várias alterações, (i) devido a artefactos, (ii) fisiológicas e (iii) patológicas, que podem afetar as características hematológicas (Clark *et al.*, 2009). É importante distingui-las, especialmente no caso de alterações fisiológicas que não são fruto de doença pois, apesar de estarem estabelecidos intervalos de referência para várias espécies de aves, existe variação entre indivíduos saudáveis da mesma espécie (Doneley, 2016).

Determinados valores variam com a idade, sexo, estação do ano, ambiente e outras influências hormonais fisiológicas (Jones, 2015). Na maioria dos casos, as influências fisiológicas afetam apenas a concentração das células e não a morfologia das mesmas, sendo, no entanto, difícil analisar cada uma em separado já que se relacionam entre elas. Por exemplo, a idade está frequentemente relacionada com a época do ano (caso de crias voadoras a entrar no primeiro inverno), que por sua vez pode influenciar a disponibilidade de alimento (Clark *et al.*, 2009; Doneley, 2016).

i) Artefactos provenientes da técnica e tratamento clínico aos quais se deve tomar atenção:

Alterações fisiológicas: stress devido ao transporte ou contenção pode levar à libertação de corticosteróides endógenos, resultando em alterações no hemograma (Doneley, 2016).

Terapêutica prévia: qualquer tratamento administrado anteriormente pode alterar resultados. Por exemplo, a administração de fluidos parenterais pode alterar a concentração de células, por diluição; a de corticosteróides exógenos pode alterar os resultados do hemograma (Doneley, 2016).

Estado clínico do paciente: traumatismo, caquexia e desidratação, bem como qualquer afeção patológica do animal, podem influenciar resultados laboratoriais (Doneley, 2016).

O método de colheita: O calibre da agulha e tamanho da seringa, tempo demorado, método de contenção e colheita utilizados, podem todos influenciar os resultados de um hemograma, existindo a possibilidade de destruição de células ou leucograma de stress (Doneley, 2016).

ii) Como foi mencionado, existem ainda influências fisiológicas que não dependem da técnica e operador, como:

A idade: está demonstrado que a idade afeta as características hematológicas de várias espécies. Foram efetuados estudos em aves, de rapina (Villegas *et al.*, 2002; Hernandez & Margalita, 2010) e de outros grupos (Howlett *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2007), nos quais foi demonstrado que o HT, a contagem total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina tendem a aumentar com a idade até ser atingida a maturidade. Ou seja, aves mais jovens tendem a ter valores inferiores aos adultos e, em alguns casos, os adultos têm um intervalo de valores maior (Howlett *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Fair, Whitaker & Pearson, 2007; Schmidt *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2009; Hernandez & Margalita, 2010; Jones, 2015).

Por outro lado, o volume total de sangue diminui aproximadamente de 12% para 6,5% com o aumento da idade e é mais elevado em machos do que em fêmeas (Fromont, 1993). A concentração de proteínas totais também varia com a idade, sendo inferior em juvenis (Villegas *et al.*, 2002).

Estas diferenças podem ser justificadas por uma necessidade acrescida de oxigénio e consequente aumento da eritropoiese nas aves adultas (Fair *et al.*, 2007; Villegas *et al.*, 2002)

Alguns estudos demonstraram também diferenças na concentração de leucócitos entre juvenis e adultos. Em várias espécies, como por exemplo em Cegonha-branca (*Ciconia ciconia*), observou-se uma diminuição da concentração de leucócitos e linfócitos com o aumentar da idade. No geral, os juvenis tendem a ter concentrações mais elevadas e variáveis de leucócitos mesmo que haja variação de linhas leucocitárias específicas. Em aves jovens, a leucocitose com heterofilia é considerada normal (Howlett *et al.*, 2002; Schmidt, 2007; Clark *et al.*, 2009; Doneley, 2016).

Pensa-se que o rácio H/L aumente com a idade das aves, apesar de tal não se encontrar reportado em aves de rapina (Limiñana *et al.*, 2009).

O sexo e estado reprodutivo: está demonstrado que apesar de o sexo e o estado reprodutivo afetarem as características hematológicas de algumas espécies de aves, tal não ocorre em todas. Por exemplo, em Peneireiro-comum (*Falco tinnunculus*) não se observaram diferenças entre sexos nos parâmetros hematológicos analisados por Kirkwood *et al.* (1979); da mesma forma que Phalen, Taylor, Phalen & Bennet (1992) não encontraram diferenças significativas entre machos e fêmeas de *Accipiter striatus* e *A. cooperi*; e Limiñana *et al.* (2009) não as encontraram em Tartaranhão-caçador (*Circus pygargus*).

Em algumas espécies de garças, gansos, rapinas e codornizes, analisadas fora da época reprodutiva, a concentração de eritrócitos e hemoglobina difere entre machos e fêmeas. Machos maduros tendem a ter um HT e contagem total de eritrócitos superiores a fêmeas maduras já que o estrogénio deprime a eritropoiese ao invés dos androgénios e da tiroxina, que a estimulam (Fromont, 1993; Schmidt *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2009; Jones, 2015).

Noutro estudo, observaram-se valores superiores de concentração de proteínas totais em fêmeas adultas face a machos adultos (Schmidt *et al.*, 2007).

É possível que a redução do HT inicial se deva a um aumento no volume sanguíneo associado à osmorregulação, necessária devido às concentrações elevadas de vitelogenina, precursor da gema em fêmeas reprodutoras. Foi encontrada uma relação entre o HT e a concentração plasmática da vitelogenina, o que demonstra que o estado reprodutor do animal também tem influência nos seus parâmetros hematológicos (Fair *et al.*, 2007).

Quanto às variações dependentes do estado reprodutivo do animal, fêmeas não reprodutoras têm um HT superior aos das que praticavam atividades reprodutivas como corte, cópula, incubação e choco. Da mesma forma, fêmeas que produzem quantidades superiores de ovos têm valores inferiores nos parâmetros eritrocitários que as restantes. Existe também um aumento da concentração total de proteínas plasmáticas em fêmeas imediatamente antes da produção do ovo. Esta hiperproteinémia é induzida pelo estrogénio e está associada a um aumento na vitelogenina e lipoproteínas, necessárias à produção da gema (Schmidt, 2007; Clark *et al.*, 2009).

O cativo: animais provenientes de cativeiro têm um hematócrito inferior a animais em estado selvagem, possivelmente devido à falta relativa de exercício físico e, visto que a comida e bebida são providenciadas *ad libitum*, não são tão susceptíveis à desidratação. Alguns autores põe a hipótese de utilização do HT para avaliação de condição corporal em animais clinicamente saudáveis. Também possivelmente devido à alimentação *ad libitum* em

animais de cativeiro, a concentração de proteínas totais é superior nestes quando comparada com animais de vida livre (Villegas *et al.*, 2002).

A estação do ano: em algumas espécies, a estação do ano faz variar parâmetros como o HT (máximo no inverno e mínimo no verão), a concentração de eritrócitos (aumentada durante o inverno), o VCM (diminuído durante o inverno). Por exemplo em Ganso-das-neves (*Anser caerulescens*) e Ganso-do-canadá (*Branta canadensis*), o HT, a concentração de eritrócitos e hemoglobina têm o seu pico durante o inverno e princípio de primavera, sendo o mínimo atingido no inverno (no caso da concentração de eritrócitos) e princípio de outono (no caso do HT e hemoglobina) (Fromont, 1993; Clark *et al.*, 2009).

Foi posta a hipótese, por Rehder & Bird (1983) que a temperatura ambiente é um dos fatores primários de influência no hematócrito das aves adultas. Assim, um aumento no HT poderia ser uma resposta adaptativa ao aumento da necessidade de oxigenação durante períodos de termogénese elevada (Fair *et al.*, 2007).

Em contraste com o constatado no perfil eritrocitário, não se encontram reportadas alterações ao perfil leucocitário devido à época do ano (Clark *et al.*, 2009).

A hora do dia: em algumas espécies observou-se variação de parâmetros hematológicos dependente da hora do dia, como no caso dos Periquito-de-colar (*Psittacula krameri*), que exibem uma variação no perfil diferencial de leucócitos dependente do ritmo circadiano, na qual as proporções de heterófilos e eosinófilos são superiores e as de linfócitos inferiores, às 06h00 comparativamente com as 24h00 (Clark *et al.*, 2009).

Em Búteo-de-cauda-vermelha (*Buteo jamaicensis*), o HT e RBCc encontram-se mais elevados de manhã e diminuem ao longo do dia. O mecanismo por detrás desta constatação não se encontra estudado (Rehder, Bird, Laguë & Mackay, 1982; Clark *et al.*, 2009).

Os hábitos migratórios: O efeito do voo de longa distância nas características hematológicas encontra-se bem estudado. Foi observada uma diminuição do HT, associada a quantidades diminuídas de gordura subcutânea, durante a migração de Estrelinha-de-poupa (*Regulus regulus*) e Chapim-azul (*Cyanistes caeruleus*). De forma semelhante, em exemplares de Fuselo (*Limosa lapponica*) avaliados durante uma paragem na migração, os exemplares que se encontravam no local há alguns dias tinham um HT e concentração de hemoglobina superiores aos chegados mais recentemente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos reticulócitos (Clark *et al.*, 2009).

Um estudo efetuado em exemplares de Seixoeira (*Calidris canutus*) e alguns passeriformes, após voo ininterrupto de longa distância, revelou uma dependência do hematócrito da massa corporal. Nesta espécie, ocorre tipicamente uma pequena diminuição do HT após a primeira hora de voo. De forma semelhante, em Columbiformes o HT diminui em

1,1% após duas a quatro horas de voo. Já em Guincho-comum adulto (*Larus ridibundus*) não se observam diferenças entre os valores pré e pós-migração, apesar de se verificar uma diminuição de valores em fêmeas juvenis pós-migração (Clark *et al.*, 2009).

A localização geográfica e população: esta influência é um bom indicador das interações complexas dos restantes fatores variados, que incluem habitat, competição, nutrição, idade, sexo, estrutura social, stress e estado hígido. Por exemplo, em exemplares de Mobilha-grande (*Gavia immer*), constatou-se que os intervalos de referência de certos parâmetros hematológicos diferiam com a localização geográfica. Os autores do estudo referenciado sugerem que as diferenças talvez se devam ao estado de hidratação e dieta (Clark *et al.*, 2009). Para além dos descritos, existem mais estudos referentes a influências fisiológicas nos parâmetros hematológicos, como inatividade, muda, nutrição e território, bem como interações entre dois ou mais fatores de influência, que são complexos e difíceis de prever (Clark *et al.*, 2009).

iii) A presença de processos patológicos pode afetar não só a concentração, mas também a morfologia das células sanguíneas. Conforme as alterações à concentração e/ou morfologia das células, podemos saber quais os processos patológicos e afeções associadas que se encontram em ação (Ver Tabelas 1, 2, 3 e 4; Clark *et al.*, 2009).

Tabela 1. Processos patológicos indicados por variação dos parâmetros hematológicos (baseada em Krautwald-Jughanns, 2007; Clark, *et al.*, 2009; Carpenter, 2013; Jones, 2015)

Parâmetro	Aumento	Diminuição
HT/RBCc	Desidratação Aumento das necessidades de oxigénio. <ul style="list-style-type: none"> Doença pulmonar obstrutiva crónica Doença obstrutiva das vias aéreas Doença respiratória crónica 	Perda de sangue <ul style="list-style-type: none"> Parasitismo Coagulopatias Sangramento gastrointestinal (GI) Destruição celular Hemoparasitas Septicémia bacteriana Aflatoxicose Doença inflamatória crónica Micobacteriose, clamidofilose, aspergilose, hepatite crónica Neoplasia Leucemia linfóide
Heterófilos	Processos inflamatórios <ul style="list-style-type: none"> Infeções bacterianas e fúngicas (incluindo <i>Mycobacterium</i> spp.) Excesso de corticosteróides <ul style="list-style-type: none"> Produção endógena Administração exógena Aves com um rácio H/L elevado podem ter uma resposta leucocitária maior.	Infeção <ul style="list-style-type: none"> Bacteriana ou viral (ex.: Psittacine Beak and Feather Disease) Má técnica de colheita, preparação e armazenamento da amostra.
Linfócitos	Estimulação antigénica crónica <ul style="list-style-type: none"> Infeções crónicas Leucemia linfocítica Excitabilidade aumentada	Excesso de corticosteróides <ul style="list-style-type: none"> Libertação endógena Administração exógena Infeção viral grave Endotoxémia Septicémia Fármacos imunossupressores
Monócitos	Clamidofilose Infeções bacterianas (incluindo <i>Mycobacterium</i> spp.) Doenças granulomatosas micóticas Necrose tissular Parasitismo	Infeção aguda Inflamação
Eosinófilos	Parasitismo gastrointestinal Reações de hipersensibilidade tipo IV tardias	Corticosteróides Stress fisiológico
Basófilos	Respostas inflamatórias iniciais, associadas à libertação de histamina	-
Trombócitos	-	Deficiência de Vitamina K Toxicidade por rodenticida Aflatoxicose Trombocitopénia associada a circovírus Síndrome de coagulação intravascular disseminada (associada a poliomavírus e reovírus) Doença ou falência hepática

Tabela 2. Processos patológicos indicados por achados nos parâmetros hematológicos (Campbell, 1995; Samour, 2006; Krautwald-Jughanns, 2007; Clark, Boardman & Raidal, 2009; Pendl & Samour, 2009, Jones, 2015; Doneley, 2016).

Concentração celular	Achados hematológicos	Interpretação
Policitemia	Aumento do hematócrito (HT>55%) e da contagem total de eritrócitos (RBCc). Índice de policromasia 2 a 3.	<i>Absoluta:</i> devido a um aumento absoluto da eritropoiese (policitemia primária, vera, secundária a hipoxia, fisiológica em resposta à altitude, ou patológica devido a doença circulatória ou respiratória crônica, hemocromatose, raquitismo, aumento hipóxico ou autônomo da produção de eritropoietina). <i>Relativa:</i> devido a hemoconcentração (por desidratação) ou redistribuição dos componentes eritrocitários ou fluidos sanguíneos. A última não ocorre em aves pois o baço não serve de reservatório de eritrócitos.
Anemia	Diminuição do hematócrito (HT<35%) e da contagem total de eritrócitos (RBCc)	<i>Absoluta:</i> indicativa de perda de eritrócitos (<i>hemorrágica</i> , em caso de trauma, alterações da coagulação, ectoparasitismo, endoparasitismo), aumento de destruição de eritrócitos (<i>hemolítica</i> , devido a hemoparasitas, algumas infecções bacterianas, anemia hemolítica imunomediada) ou de diminuição da produção de eritrócitos (<i>hipoproliferativa</i> , por deficiência nutricional, infecção crônica, doença renal crônica, leucose aviária ou toxicose). <i>Relativa:</i> Sobrehidratação, geralmente iatrogênica. Classificam-se ainda em <i>regenerativas</i> (presença de policromasia, reticulocitose, macrocitose e anisocitose; geralmente devido a perda aguda de sangue), <i>não regenerativas</i> (índice de policromasia, IP, 1 a 2; resposta medular reduzida, devido a inflamação ou infecção crônica, algumas doenças virais, clamidofilose aguda ou crônica, toxicose, deficiência de ferro, hipotireoidismo e leucemia), <i>hemolíticas</i> (IP 4 a 5, regenerativas por natureza; devido a destruição por hemoparasitas, septicemia bacteriana, toxicose aguda ou condições imunomediadas) e <i>hemorrágicas</i> (IP 2 a 5; traumatismo, parasitismo GI, rodenticidas, aflatoxicose e algumas doenças virais).
Heterofilia	Concentração de heterófilos superior a limite máximo do intervalo de referência.	Associada a doenças inflamatórias ou infecciosas, tanto agudas como crônicas, ou stress. Indicativo de inflamação. Normal em aves jovens.
Heteropenia	Concentração de heterófilos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Rara em aves, associada a leucopenia. Pode ocorrer devido a infecções e inflamações marcadas, resultando em depleção da reserva medular de granulócitos.
Eosinofilia	Concentração de eosinófilos superior a limite máximo do intervalo de referência.	É rara em muitas espécies de aves e geralmente apenas relativa e não absoluta; poderá dever-se a parasitismo, apesar de não ter sido encontrada ainda correlação entre este e parasitismo ou reação anafilática. Geralmente deve-se a dano tissular marcado, especialmente em dermatopatias. A indução de eosinofilia com antígenos parasitários tem-se apresentado difícil.
Basofilia	Concentração de basófilos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Raro em aves.
Linfocitose	Concentração de linfócitos superior a limite máximo do intervalo de referência.	Incomum em aves. Pode resultar de estimulação antigénica associada a doenças infecciosas ou inflamatórias. Observado em leucemia linfocítica.

Tabela 2. Processos patológicos indicados por achados nos parâmetros hematológicos (cont.)

Linfopénia	Concentração de linfócitos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Pode ocorrer quando há um aumento marcado de heterófilos. Geralmente indicativo de stress (ocorre quando existe excesso de corticosteróides endógenos ou exógenos). Doenças virais, danos na Bursa de Fabricius ou pancitopénia.
Monocitose	Concentração de monócitos superior a limite máximo do intervalo de referência.	Infeção por <i>Chlamydomphila</i> spp. ou outras infeções crónicas como micoses, doenças granulomatosas bacterianas e micóticas, tuberculose e necrose tissular disseminada.
Trombocitose	Concentração de trombócitos superior a limite máximo do intervalo de referência.	Em resposta a trombocitopénia ou doença inflamatória crónica, após hemorragia ou devido a aumento da fagocitose não específica.
Trombocitopénia	Concentração de trombócitos inferior ao limite mínimo do intervalo de referência.	Devido a destruição excessiva ou exigência aumentada, em casos de septicémia ou coagulação intravascular disseminada. Pancitopénia (supressão da medula óssea) e algumas doenças virais. Pode também dever-se a agregação na preparação (artefacto).

Quanto às alterações morfológicas das células sanguíneas, como foi referido anteriormente, estas podem auxiliar na identificação de processos patológicos.

Tabela 3. Processos patológicos indicados por morfologia atípica das linhas celulares (Campbell, 1995; Krautwald-Junghans; 2007; Clark *et al.*, 2009; Pendl & Samour, 2009).

Linha celular	Morfologia atípica	Definição e Interpretação
Eritrócitos	Policromasia	Concentração elevada de eritrócitos policromáticos, indicam que a taxa de eritropoiese se encontra elevada (aves jovens, anemia).
	Poiquilocitose	Concentração elevada de poiquilócitos (eritrócitos com forma anormal); indicam maturação assíncrona associada a eritropoiese acelerada.
	Anisocitose	Variação anormal do tamanho dos eritrócitos, presente em doenças que afetem a produção ou levem a destruição de eritrócitos
	Corpos de inclusão	Corpos de Heinz: protrusões arredondadas da membrana celular, constituídas por agregados de hemoglobina. Indicativas de lesão oxidativa.
		Corpos de Howell-Jolly: Partículas pequenas esféricas dispersas no citoplasma, resultantes de divisão nuclear anormal. Em grande quantidade indicam disfunção eritropoiética.
		Pontuações basofílicas: presença de agregados ribossomais residuais. Podem ser indicativos de doença (intoxicação, deficiência em hemoglobina, etc.) ou de resposta regenerativa a anemia.
Heterófilos	Vacuolização	Vacuolização do citoplasma, pode ser indicativo de intoxicação por chumbo.
	Eritroplastídeos	Ausência de núcleo, sem significado se em número reduzido.
	Toxicidade celular	+1: Citoplasma ligeiramente basófilo.
		+2: Citoplasma basófilo, alguma desgranulação.
		+3: Citoplasma marcadamente basófilo, desgranulação moderada e vacuolização do citoplasma.
		+4: Citoplasma fortemente basófilo, desgranulação marcada (com grandes grânulos formados por fusão), grande vacuolização do citoplasma e cariorréxis e cariólise.
Linfócitos	Aspeto	Aumento da basofilia e tamanho da célula.
	Grânulos azurófilos	Grânulos citoplasmáticos redondos eosinofílicos.
	Pseudópodes	Projeções citoplasmáticas, indicativas de ativação celular.
Trombócitos	Aspeto	Membrana celular de forma irregular, citoplasma vacuolizado, basofílico e presença de pseudópodes. Núcleo pode encontrar-se picnótico.

O índice de policromasia, mencionado anteriormente, categoriza a concentração de células policromáticas e dá-nos informação importante sobre a eritropoiese, indicando o nível de regeneração de eritrócitos.

Tabela 4. Índice de policromasia (Krautwald-Junghanns, 2007; Clark *et al.*, 2009; Pendl & Samour, 2009)

Índice de policromasia	%	Aspeto geral	Critério morfológico	Interpretação
1	0	Homogéneo	Forma e estrutura dos eritrócitos homogénea. Poucas ou nenhuma células policromáticas.	Fisiológico. Possível desvio à direita, por ligeira depressão eritropoiética.
2	<10	Ligeiramente irregular	Presença de algumas células policromáticas, eritrócitos ligeiramente heterogéneos.	Fisiológico, normal.
3	10 a 20	Moderadamente irregular	Células policromáticas observadas frequentemente.	“Left-shift”. Ligeiro aumento da eritropoiese.
4	20 a 50	Claramente irregular	Número elevado de células policromáticas, alguma poiquilocitose.	“Left-shift” regenerativo a degenerativo. Aumento da eritropoiese.
5	>50	Extremamente irregular	Presença de muitas células policromáticas, poiquilocitose marcada.	“Left-shift” degenerativo. Grande aumento de eritropoiese.

2.3. Análises parasitológicas

2.3.1. Hemoparasitas

Os hemosporídeos, pertencentes ao filo Apicomplexa, são um grupo de distribuição cosmopolita composto por parasitas intracelulares de células sanguíneas e tecidos que têm por vetor biológico dípteros sugadores de sangue. Estão descritas infecções dos mesmos em hospedeiros pertencentes à maior parte das famílias de aves. São considerados um grupo filogeneticamente destacado de hemoparasitas heteroxenos, capazes de parasitar aves, anfíbios, répteis e mamíferos (Valkiūnas, 2005; Martinsen, Blumberg, Eisen & Schall, 2008).

Vasily Danilewsky, fisiologista e professor russo, descreveu hemoparasitas no sangue periférico de aves (das famílias Accipitridae, Laniidae e Corvidae) pela primeira vez em 1885, publicando o pequeno artigo “*About Blood Parasites (Haematozoa)*” na revista *Russian Medicine*. A principal importância destes achados foi o facto de vir a confirmar a larga distribuição de protozoários intracelulares em vertebrados, o grande detalhe em que foi estudada e registada a morfologia das várias fases de desenvolvimento dos parasitas, bem como o detalhe e precisão das descrições e ilustrações da sua estrutura (Valkiūnas, 2005).

Foram também as suas observações ecológicas, associadas à dinâmica sazonal das infecções por hemoparasitas, que o levaram à conclusão que a prevalência das infecções aumenta em estações quentes e que a parasitémia se correlaciona com a temperatura do ambiente. Estas observações serviram de base à ideia de que vetores tomam parte na disseminação dos parasitas (Valkiūnas, 2005).

Os hemosporídeos são frequentemente observados em esfregaços de sangue periférico de aves (Campbell, 1995), existindo registo de infeção em 68% das espécies examinadas (Atkinson & Van Ripper III, 1991).

Os parasitas mais comumente encontrados em sangue periférico de ave são microfilárias e parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, dos géneros *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium* (Valkiūnas, 2005; Clark *et al.*, 2009). Estes estão descritos, respetivamente, em 67%, 39% e 41,5% das espécies analisadas infetadas (Atkinson & Van Ripper III, 1991). Considera-se que a maior parte das espécies de *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. têm especificidade de hospedeiro, pelo menos a nível da família, enquanto muitos *Plasmodium* spp. têm uma grande variedade de hospedeiros. Existem, obviamente, exceções como as aves imunocomprometidas (Peirce, Lederer & Adlard, 2004).

Existem divergências taxonómicas quanto à família onde estes géneros se inserem, sendo que autores como Martinsen *et al.* (2008) os agrupam, de acordo com a classificação

feita por Levine em 1988, numa única família, Plasmodiidae. Por outro lado, Valkiūnas (2005) separa o género *Leucocytozoon* na sua própria família, Leucocytozoidae.

O género *Haemoproteus* engloba um grande número de espécies de protozoários intracelulares e encontram-se já descritas mais de 130 espécies distintas em 72 famílias de ave (Peirce *et al.*, 2004; Valkiūnas, 2005), sendo assim o mais abrangente dos géneros de hemoparasitas aviários (Krone, Waldenström, Valkiūnas, Lessow, Müller, Fickel & Bensch, 2008). Das 135 espécies descritas em aves foram já morfologicamente relatadas em Falconiformes seis, enquanto quatro o foram em Strigiformes (Krone *et al.*, 2008).

Já o género *Plasmodium*, que causa a malária aviária, inclui mais de 40 espécies distribuídas por todo o globo. Destas, cinco foram descritas em Falconiformes e outras cinco em Strigiformes (Valkiūnas, 2005; Krone *et al.*, 2008).

Quanto ao género *Leucocytozoon*, encontra-se disseminado por todo o globo com 36 espécies distintas e específicas para certas famílias de hospedeiro. Destas, apenas uma foi descrita em Falconiformes (*L. toddi*) e outra em Strigiformes (*L. danilewskyi*, sinónimo de *L. ziemanni*) (Valkiūnas, 2005; Krone *et al.*, 2008). O termo *Leucocytozoon* refere-se ao facto de este protozoário ter leucócitos como célula hospedeira (Campbell & Ellis, 2007).

A ecologia e dinâmica de transmissão dos parasitas dos três géneros difere bastante, já que os parasitas de cada um utilizam vetores pertencentes a diferentes taxa de insetos sugadores.

As espécies de *Leucocytozoon*, são disseminadas por simulídeos (família Simuliidae) excetuando a espécie *Leucocytozoon caulleryi*, que tem por vetor insetos da família Ceratopogonidae, como o subgénero *Parahaemoproteus* (Valkiūnas, 2005; Forrester & Greiner, 2008; Martinsen *et al.*, 2008).

As espécies do género *Haemoproteus* spp. são agrupadas em dois subgéneros, conforme a especificidade de vetor: *Parahaemoproteus*, transmitidos por dípteros telmofágicos da família Ceratopogonidae, principalmente *Culicoides* spp., e *Haemoproteus*, transmitidos por moscas hipoboscídeas da família Hippoboscidae (p. ex. *Pseudolynchia* spp.) (Valkiūnas, 2005).

Plasmodium spp. é transmitido por fêmeas de mosquitos picadores (família Culicidae), principalmente dos géneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* e *Anopheles*, que são as únicas que se alimentam de sangue e, logo, transmitem a malária aviária (Campbell & Ellis, 2007).

A identificação do género destes parasitas pode geralmente ser efetuada a partir das características microscópicas observadas do organismo. Outros géneros menos observados, mas também relatados, são *Atoxoplasma*, *Aegyptianella*, *Borrelia* e *Trypanosoma* (Fromont, 1993; Campbell, 1995; Valkiūnas, 2005).

2.3.1.1. Ciclo de vida

As espécies de *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* têm ciclos de vida semelhantes que envolvem ciclos de reprodução assexuada tanto no hospedeiro aviário como no vetor artrópode (Atkinson & Van Riper III, 1991; Peirce *et al.*, 2004; Valkiūnas, 2005; Clark *et al.*, 2009).

A transmissão ocorre quando os esporozoítos são introduzidos no hospedeiro vertebrado juntamente com as secreções salivares do vetor sugador de sangue (Atkinson & Van Riper III, 1991).

Após entrar na circulação sanguínea, estes invadem os tecidos e, no interior das células endoteliais, desenvolvem-se e dão origem por reprodução assexuada (esquizogonia) a inúmeros merozoítos alongados, contidos em merontes exoeritrocitários. Estes merontes maturam, formando megalomerontes (Atkinson & Van Riper III, 1991; Peirce *et al.*, 2004).

Após rutura dos megalomerontes e dependendo do hemosporídeo em questão, os merozoítos invadem outras células (que podem ser leucócitos e células do endotélio vascular), iniciando novos processos de esquizogonia nos tecidos do hospedeiro ou invadindo as células hemáticas circulantes (Atkinson & Van Riper III, 1991; Peirce *et al.*, 2004).

Os merozoítos que invadem as células circulantes podem continuar os seus processos de merogonia, como no caso de *Plasmodium* spp., ou dar origem a gametócitos (micro – masculinos; macro – femininos) que poderão infetar outro vetor (Atkinson & Van Riper III, 1991; Valkiūnas, 2005).

No caso de *Plasmodium* spp. esta fase de desenvolvimento divide-se em merogonia exoeritrocitária e eritrocitária, e o primeiro estágio divide-se em merogonia exoeritrocitária primária (pré-eritrocítica) e secundária (pós eritrocítica) (Valkiūnas, 2005).

Assim, a merogonia referenciada nos parágrafos anteriores, no caso de *Plasmodium* spp., trata-se da merogonia pré-eritrocítica na qual se forma a primeira geração de merontes, ou criptozoítos. Os merozoítos resultantes desta primeira geração não têm a capacidade de parasitar células sanguíneas, parasitando então macrófagos de capilares sanguíneos e outras células endoteliais (capilares cerebrais, pulmões, rim, fígado e baço) onde se desenvolve a segunda geração de merontes exoeritrocitários primários, os metacriptozoítos (Valkiūnas, 2005; Campbell & Ellis, 2007).

Após rutura dos metacriptozoítos, são libertados merozoítos para a circulação com capacidade de parasitar células endoteliais (incluindo cerebrais), que induzem merogonia pós-eritrocítica (dando origem a merontes exoeritrocitários secundários, ou fanerozoítos) e novas

gerações de merogonia pré-eritrocítica, perpetuando a reprodução assexuada do parasita (Peirce *et al.*, 2004; Valkiūnas, 2005).

São também libertados merozoítos capazes de parasitar eritrócitos e que, após o conseguirem, se tornam ovais ou redondos (trofozoítos) podendo induzir merogonia eritrocitária, formando merontes eritrocitários. A maturação e rutura dos fanerozoítos também liberta em circulação merozoítos capazes de parasitar células endoteliais e eritrócitos, que podem dar lugar tanto a reprodução sexuada como assexuada (Valkiūnas, 2005).

Os merozoítos capazes de parasitar eritrócitos podem, então, proceder de metacriptozoítos, fanerozoítos ou merontes eritrocitários e em vez de perpetuarem a reprodução assexuada do parasita, iniciam o desenvolvimento sexual, formando macro e microgametócitos, como descrito nos restantes géneros de hemosporídeo (Valkiūnas, 2005).

Neste ponto, os ciclos de vida tornam a ser muito semelhantes. Quando os gametócitos são ingeridos por um vetor adequado, ocorre o desenvolvimento sexual dos mesmos, que abandonam as suas células, passam por gametogénese (onde se formam o macro e o microgâmeta a partir dos gametócitos, por exflagelação) e o macrogâmeta é fertilizado pelo microgâmeta. Esta reprodução sexuada dá origem a um zigoto fértil que se diferencia rapidamente num oocineto (móvel) que penetra as células epiteliais do intestino do vetor, onde se torna num oocisto esférico (Atkinson & Van Riper III, 1991; Peirce *et al.*, 2004; Valkiūnas, 2005).

Por esporogonia, um tipo de reprodução assexuada, produzem-se vários esporozoítos que promovem a rutura da membrana do oocisto maduro e entram no hemocélio do inseto, a partir do qual podem penetrar as glândulas salivares do mesmo e inocular novo hospedeiro durante a próxima refeição do vetor (Atkinson & Van Riper III, 1991; Peirce *et al.*, 2004; Valkiūnas, 2005).

Apesar da semelhança existente entre os ciclos de vida de hemosporídeos, estes apresentam diferenças em relação ao tipo de tecido no qual a esquizogonia assexuada ocorre. Enquanto *Leucocytozoon* spp. e *Haemoproteus* spp. apenas o fazem em células fixas não-circulantes do hospedeiro (como hepatócitos e células do endotélio vascular), sendo as únicas formas encontradas em células sanguíneas os gametócitos, no caso de *Plasmodium* spp. a esquizogonia dá-se tanto em células fixas como circulantes e podem-se encontrar, em eritrócitos, tanto merontes eritrocitários como gametócitos, de acordo com o descrito anteriormente (Atkinson & Van Riper III, 1991; Campbell & Ellis, 2007).

Esta diferença é relevante na medida em que, uma vez que os merontes eritrocíticos de *Plasmodium* spp. contém estádios de reprodução assexuada do parasita, estes podem transmitir infeção a novos hospedeiros por inoculação intraperitoneal, venosa ou muscular do

sangue infetado. Por outro lado, os gametócitos de *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. apenas se tornam infetantes após passagem por um vetor artrópode (Atkinson & Van Riper III, 1991; Valkiūnas, 2005; Campbell & Ellis, 2007).

Outra diferença nos seus ciclos de vida está relacionada com o desenvolvimento de merontes nos tecidos do hospedeiro. Certas espécies de *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. formam megalomerontes de grandes dimensões nos tecidos, contendo milhões de merozoítos. Em contraste, espécies de *Plasmodium* spp. formam merontes tissulares de dimensões mais reduzidas, contendo apenas dezenas a centenas, de merozoítos (Atkinson & Van Riper III, 1991; Valkiūnas, 2005).

O método de distinção e organização taxonómica destes parasitas utilizado correntemente baseia-se na família ou espécie do hospedeiro bem como a morfologia das formas encontradas na circulação periférica. As características usadas para distinguir hemosporídeos em esfregaços de sangue incluem a presença ou ausência de grânulos pigmentados, o tamanho e forma dos parasitas intraeritrocitários e a presença ou ausência de esquizogonia assexuada nas células circulantes do sangue (Atkinson & Van Riper III, 1991).

Os grânulos pigmentados de hemozoína são produzidos por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., mas não por *Leucocytozoon* spp., após digestão da hemoglobina. Muitas espécies de *Leucocytozoon* spp. são distintas, também, pelas extensas alterações que produzem na morfologia das células do hospedeiro bem como a sua capacidade de desenvolvimento em linfócitos circulantes. A distinção entre *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., como mencionado anteriormente, pode ser feita observando a presença ou ausência de esquizogonia eritrocítica (Atkinson & Van Riper III, 1991; Campbell, 1995; Clark *et al.*, 2009; Valkiūnas, 2005).

Concretamente, o diagnóstico de infeção por *Haemoproteus* spp. é feito pela identificação em esfregaços de sangue periférico dos gametócitos intra-eritrocitários e ausência de merontes, presentes no caso de *Plasmodium* spp. (Campbell & Ellis, 2007; Clark *et al.*, 2009). Em gametócitos pigmentados de certas espécies de *Haemoproteus* spp. podem-se observar grânulos não refringentes de cor violeta denominados volutina (Valkiūnas, 2005). Os gametócitos podem ser encontrados em 5 formas distintas, microhalteridial, halteridial (a mais comum), circumnuclear, rabdosossal e discossossal (Valkiūnas, 2005; Clark *et al.*, 2009). É ainda possível distinguir os macro e microgametócitos deste género, sendo que os primeiros apresentam um núcleo compacto rodeado de citoplasma denso e fortemente basofílico com grânulos uniformemente distribuídos e os últimos têm um núcleo menos denso rodeado de citoplasma basofílico claro, sendo os grânulos mais escassos e em posição polar

(Clark *et al.*, 2009). O volume ocupado do eritrócito hospedeiro aumenta com a maturidade do parasita, enquanto que o deslocamento no núcleo diminui (Campbell & Ellis, 2007).

No caso de *Plasmodium* spp. o diagnóstico é feito com base na observação de gametócitos e trofozoítos intraeritrocitários já que este género possui merogonia no sangue periférico. Os vários estádios do seu ciclo de vida podem ser encontrados em leucócitos e trombócitos, podendo os gametócitos deslocar o núcleo dos mesmos em certos casos (Campbell & Ellis, 2007). Os gametócitos são polimórficos, sendo irregularmente redondos ou alongados e contendo também hemozoína em grânulos refringentes (Campbell & Ellis, 2007; Clark *et al.*, 2009). Excetuando os fanerozoítos cuja forma é alongada, os merontes exoeritrocitários são redondos ou ovais, contendo grânulos refringentes de hemozoína castanha, preta ou dourada. A diferenciação entre espécies baseia-se na localização e morfologia dos merontes e no número de merozoítos contidos nos mesmos (Valkiunas, 2005; Campbell & Ellis, 2007; Clark *et al.*, 2009).

Uma característica essencial para a distinção correta de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. é a deformação que o gametócito de *Plasmodium* causa no eritrócito e, mais importante, o deslocamento do seu núcleo (Valkiunas, 2005; Campbell & Ellis, 2007).

Por último, o diagnóstico de *Leucocytozoon* spp. é feito por observação dos seus gametócitos no sangue periférico, cuja morfologia é muito variável: existem dois tipos morfológicos distintos, um redondo (resultante da primeira geração de merontes) e outro fusiforme (resultante da rutura de megalomerontes) (Campbell, 1995; Clark *et al.*, 1995). Algumas espécies apresentam apenas uma destas formas enquanto noutras ambas são observadas (Samour, 2000). Podem ainda distinguir-se micro e macrogametócitos, já que os primeiros apresentam uma coloração leve com citoplasma basofílico e um núcleo pouco denso (eosinofílico) e os últimos uma coloração forte, com o núcleo condensado e o citoplasma vacuolizado, ambos basofílicos (Campbell, 1995; Clark *et al.*, 1995). Ambos causam deformação extensa da célula hospedeira cujo núcleo é deslocado para a periferia e o tamanho aumenta, dificultando a identificação da célula original. Estas alterações são mais óbvias no caso dos gametócitos fusiformes, que conferem à célula uma forma alongada característica deste género (Campbell, 1995; Valkiunas, 1995; Forrester & Greiner, 2008; Clark *et al.*, 2009). Como foi anteriormente referido, este género de hemosporídeo não produz grânulos de hemozoína já que toda a hemoglobina é digerida pelos merozoítos eritrocitários. No entanto, em algumas espécies podem observar-se grânulos de volutina não refringentes azulados (Campbell, 1995; Valkiunas, 1995).

Os diferentes níveis de virulência destes três géneros de hemosporídeo têm origem em diferenças que existem durante a fase assexuada do seu ciclo em relação à concentração

sanguínea e tecidos afetados no hospedeiro vertebrado (Valkiūnas, 2005; Donovan, 2008; Santiago-Alarcon, Palinauskas & Schaefer, 2012). Da mesma forma, os efeitos patológicos da infecção por *Leucocytozoon* spp., *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. podem correlacionar-se com o desenvolvimento e ciclo de vida destes protozoários nos tecidos e células hemáticas circulantes dos seus hospedeiros (Atkinson & Van Riper III, 1991).

De modo geral e em circunstâncias normais, as espécies de *Haemoproteus* spp. são consideradas apatogénicas e algumas espécies dos géneros *Leucocytozoon* spp. e *Plasmodium* spp. são consideradas patogénicas. Quando se verificam sinais clínicos, estes tendem a estar associados com esplenomegália, anemia, hepatomegália e edema pulmonar (Greiner & Ritchie, 1994).

Apesar de a maior parte das infeções serem subclínicas, em animais debilitados as infeções podem levar a anemias graves, pondo em risco a vida do hospedeiro. Mesmo no caso de espécies apatogénicas de *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp., quando a parasitémia é elevada podem ocorrer sinais clínicos em aves sujeitas a stress ou imunodeprimidas (Atkinson & Van Riper III, 1991; Greiner & Ritchie, 1994; Valkiūnas, 2005).

Os sinais clínicos mais frequentes na infecção por *Haemoproteus* spp. são depressão, anemia hemolítica, anorexia, diminuição da taxa de crescimento e sintomatologia neurológica (Cardona *et al.*, 2002; Campbell & Ellis, 2007; Atkinson, 2008). Existem ainda casos documentados de espécies altamente virulentas deste parasita, capazes de causar miosite grave. Nesta observam-se petéquias e pequenos enfartes no músculo cardíaco e esquelético, sendo também possível a morte súbita da ave, sem lesões indicativas de parasitémia (Cardona *et al.*, 2002; Cannel *et al.*, 2003; Garvin & Greiner, 2003; Atkinson, 2008).

Em Columbofilia considera-se que os animais infetados por *H. columbae* apresentam performances inferiores aos demais, mesmo que não apresentem sinais de infecção clínica (Ahmed & Mohammed, 1978; Greiner & Ritchie, 1994).

Em relação a *Leucocytozoon*, apesar da sua grande variedade de espécies e hospedeiros, apenas algumas destas são patogénicas para os hospedeiros (Atkinson & Van Riper III, 1991; Greiner & Ritchie, 1994). Na realidade, muitos dos surtos de mortalidade que são atribuídos a *Leucocytozoon* devido à observação durante a necrópsia de megalomerontes nos tecidos musculares são, muito provavelmente, resultado de infeções por *Haemoproteus* (Greiner & Ritchie, 1994).

Leucocytozoon tem uma incidência sazonal em espécies selvagens, com picos de parasitémia na primavera e após os quais as contagens diminuem (Valkiūnas, 2005).

Cerca de 4 a 9 dias após a infecção, podem-se detetar grandes números do parasita em circulação. Este produz um fator anti-eritrocítico que causa hemólise intravascular e anemia, geralmente o primeiro sinal clínico de infecção (Greiner & Ritchie, 1994).

Os restantes sinais clínicos associados à sua infecção são também, na sua generalidade, inespecíficos pois variam com a idade e estado hígido do hospedeiro. Os mais comuns são anemia hemolítica, anorexia e depressão, podendo também observar-se esplenomegália e hepatomegália com necrose hepática e consequente aumento dos parâmetros bioquímicos AST e ALT (Campbell & Ellis, 2007; Forrester & Greiner, 2008).

Existem três espécies deste género reportados como patogénicas para aves em meio selvagem, sendo estas: *L. simondi* que infeta Anseriformes, *L. marchouxi* que infeta Columbiformes, e *L. toddi* que infeta falconiformes (Forrester & Greiner, 2008).

Os grupos aviários mais susceptíveis são os Anseriformes, os Columbiformes, os Galiformes e as rapinas diurnas na sua generalidade. As espécies respetivas de *Leucocytozoon* spp. são particularmente patogénicas em Anseriformes e Galiformes jovens (Greiner & Ritchie, 1994; Valkiūnas, 2005; Forrester & Greiner, 2008).

Quanto às espécies de *Plasmodium* spp., foram descritas extensamente em aves de companhia e aviário, já que são os hemosporídeos com maior variedade de hospedeiros. Espécies apatogénicas causam infecção assintomática em Passeriformes, que servem de reservatório do parasita (Greiner & Ritchie, 1994). Contudo, algumas espécies são extremamente patogénicas, sendo exemplo desses casos as infeções em canários, pinguins, Anseriformes, Galiformes, Columbiformes e Falconiformes. Foram também descritas espécies apatogénicas em muitas das ordens mencionadas (Greiner & Ritchie, 1994; Valkiūnas, 2005; Campbell & Ellis, 2007). A exposição a um número elevado de esporozoítos infetantes leva a uma maior parasitémia, sendo a sintomatologia também mais grave e a mortalidade maior (Atkinson *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos são mais comuns em aves recentemente infetadas e os mais característicos são anorexia, anemia, depressão, linfocitose, leucocitose, hemoglobínúria, podendo em alguns casos ocorrer morte súbita (Campbell & Ellis, 2007). Os merontes exoeritrocitários podem ainda bloquear capilares cerebrais, levando a necrose dos tecidos adjacentes e consequente sintomatologia de paralisia cerebral (Valkiūnas, 2005).

Apesar destas diferenças, o processo infeccioso apresenta fases clínicas semelhantes:

1. Fase pré-patente: o parasita desenvolve-se nos tecidos, passando pelos seus ciclos de merogonia e estando ausente das células circulantes do sangue;
2. Fase aguda: o parasita aparece na circulação sanguínea, dando-se um forte aumento da parasitémia;

3. Fase de crise: pico da parasitemia e stress fisiológico;

4. Fase latente/crônica: a resposta imunitária reduz a parasitemia a níveis baixos e hospedeiros sobreviventes exibem poucos ou nenhuns sinais de infecção (Atkinson & Van Riper III, 1991; Valkiūnas, 2005).

Após a infecção, o hospedeiro pode funcionar como portador assintomático do parasita, mantendo-o durante vários anos, ou mesmo toda a sua vida, e sendo uma fonte de infecção permanente. Por outro lado, desenvolvem algum grau de resistência a reinfeção por estirpes homólogas de parasita e muitas vezes exibem infecções crônicas ou latentes, que podem não ser detetáveis no esfregaço até reativação hormonal (recaída de primavera) ou por stress ambiental ou fisiológico (Atkinson & Van Riper III, 1991; Valkiūnas, 2005).

2.3.2. *Parasitas gastrointestinais*

Encontram-se descritas infecções por Protozoários e Helmintes, sendo que os últimos se encontram divididos em três filos sem relação taxonómica: Nematoda, Platyhelminthes (classes Cestoda e Trematoda) e Acantocephala (Krone & Cooper, 2002; Krone, 2007; Locker & Hofkin, 2015).

As coccídeas, seres unicelulares obrigatórios, são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa. Este é caracterizado por conter parasitas cujos sintomas de infecção provêm da destruição das células do hospedeiro (Krone & Cooper, 2002; Bowman, 2009). Pertencem a este grupo protozoários dos géneros *Eimeria*, *Sarcocystis* e *Avispora*, cuja infecção é frequente e relevante em aves (Krone & Cooper, 2002).

O género *Eimeria* engloba parasitas cuja transmissão é feita pela ingestão de oocistos, quer no alimento, como na bebida. O seu ciclo de vida é direto e inclui ciclos de reprodução assexuada (merogonia) e sexuada (gametogonia), que ocorre no epitélio intestinal e onde têm origem oocistos que, após eliminação pelas fezes, esporulam (merogonia) e se tornam infetantes (Bowman, 2009; Zucca & Delogu, 2010).

Estes oocistos contêm quatro esporocistos nos quais cada um deles por sua vez contém dois esporozoítos (Coles, 2007; Bowman, 2009; Zajac & Conboy, 2012).

Upton *et al.* (1990, cit. por Krone & Cooper, 2002), descreveu 18 espécies de *Eimeria* spp. em aves selvagens.

O género *Sarcocystis* contém parasitas com ciclo de vida indireto, para os quais as aves são hospedeiros definitivos (HD) ou intermediários (HI), sendo por vezes ambos em simultâneo (Coles, 2007). Aquando da ingestão de esporocistos infecciosos pelo HI - que, de acordo com Krone & Cooper (2002), pode ser tanto um roedor como uma ave - estes libertam

esporozoítos no intestino, penetrando até ao endotélio arterial dos linfonodos mesentéricos onde ocorre reprodução assexuada (merogonia) (Greiner, 2008; Bowman, 2009).

Estes ciclos de merogonia instalam-se também nas células endoteliais de vários outros órgãos (de acordo com Krone & Cooper, em 2002, foram encontrados quistos de *Sarcocystis* em músculo esquelético e coração de rapinas), sendo o seu produto final merozoítos que penetram o tecido muscular. Por endopoligonia, estes formam bradizoítos, formas infecciosas que maturam no tecido e infetam os hospedeiros definitivos (carnívoros) que os ingerem juntamente com o músculo. Os bradizoítos penetram então nas células do endotélio intestinal onde ocorre reprodução sexuada (gametogonia), culminando na formação de oocistos que vão passar por um último ciclo de reprodução assexuada (esporogonia). Os esporocistos são eliminados nas fezes do HD, sendo infecciosos para o HI sem necessitar de maturação no meio ambiente (Greiner, 2008; Bowman, 2009). Estes contêm dois esporocistos, que por sua vez contêm quatro esporozoítos (Coles, 2007; Greiner, 2008).

Em 1998, Odening (cit. por Krone & Cooper, 2002) listou 12 espécies de *Sarcocystis* spp. que utilizam aves de rapina como HD.

Quanto ao género *Avispora*, este contém parasitas cujo ciclo de vida é indireto em estado selvagem, sendo que as aves de rapina em vida livre se infetam pela ingestão de presas, HI, geralmente roedores (Krone, 2002). Em cativeiro, o ciclo de vida é aparentemente direto, possivelmente utilizando também minhocas como hospedeiro paraténico (Heidenreich, 1996 cit. por Krone, 2002). Estes parasitas multiplicam-se no epitélio do intestino delgado do HD e são excretados nas fezes (Krone & Cooper, 2002). Os oocistos esporulam no exterior e contêm um único esporocisto que, por sua vez, contêm oito esporozoítos (Coles, 2007; Krone, 2007; Zajac & Conboy, 2012).

As infeções por *Avispora* spp. são um problema comum e, muitas vezes, grave em animais em cativeiro nos centros de reprodução (Heidenreich, 1996 cit. por Krone, 2002), afetando muitos animais entre os 28 e os 55 dias de idade. A prevalência desta doença em exemplares jovens poderá dever-se a uma diminuição da imunidade maternal, desenvolvimento incompleto da sua própria imunidade ativa ou ambos (Krone, 2002).

Conhecem-se 16 espécies de *Avispora* spp. descritas em aves de rapina, no entanto a maioria dos estudos foca-se em animais de cativeiro pelo que a distribuição e importância em aves selvagens ainda não é muito conhecida (Krone, 2002). Segundo Klüh (1994), foi encontrado *C. boeri* em sete de 15 espécimes de Peneireiro-comum (*F. tinnuncullus*) selvagens na Alemanha. Kutzer *et al.* (1980) observou oocistos de *A. falconis* e *Avispora* spp. em indivíduos da mesma espécie na Áustria.

As infecções por coccídeas nem sempre provocam sintomas graves, podendo por vezes ser completamente inaparentes. Nestes casos é conseguido um equilíbrio com o hospedeiro, que apenas manifestará a doença em situações de stress ou imunossupressão (Coles, 2007; Zajac & Conboy, 2012). Os sinais clínicos mais comuns são perda de peso, inapetência, depressão, vômito, fezes hemorrágicas, diarreia e mortalidade aguda (Krone & Cooper, 2002).

A patogenicidade dos géneros mencionados varia, sendo *Caryospora* spp. o mais patogénico em animais de cativeiro e afetando essencialmente falconiformes jovens, que apresentam diarreia grave e morte aguda. Após contato com o parasita, supõe-se que é desenvolvida alguma imunidade (Krone & Cooper, 2002; Zucca & Delogu, 2010).

A patogenicidade de *Sarcocystis* spp. é controversa, sendo frequente a ausência de sintomas, mas encontrando-se também descritos danos intestinais extensos em casos de coccidiose grave por *Sarcocystis* e dois casos de encefalite em aves de rapina (Açor, *Accipiter gentilis* e Águia-real, *Aquila chrysaetos*) que apresentavam sinais neurológicos: debilidade unilateral, paralisia e *head tilt* (Krone & Cooper, 2002).

Outros géneros de coccídea descritos em aves são *Toxoplasma* spp., sendo provável que as aves de rapina sejam utilizadas por *Toxoplasma gondii* como HI, e *Giardia* spp., descrito em Urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) e cuja significância nesta ou outras espécies é pouco conhecida (Krone & Cooper, 2002).

Os helmintes, como antes mencionado, dividem-se em três filos com características superficiais semelhantes (como por exemplo a forma alongada do corpo). Estes podem ser distinguidos pelo aspeto macroscópico do parasita e são um grupo muito diverso e relevante em aves selvagens (Zucca & Delogu, 2007; Bowman, 2008).

A sua distribuição é cosmopolita, no entanto tanto esta como a forma de transmissão são muito influenciadas pelo ambiente e consequente presença do HI – geralmente um invertebrado (McLaughlin, 2008; Dorrenstein, 2009). Em alguns casos, o HI final é influenciado pelo parasita de modo a facilitar a sua captura e aumentar a probabilidade de infeção do HD (Krone & Cooper, 2002).

Como na generalidade dos parasitas, em hospedeiros saudáveis a infeção pode ser assintomática. No entanto, em casos de stress ou imunossupressão os sintomas de doença tendem a agravar (Krone & Cooper, 2002; Samour, 2006; Tezel, Girisgin, Birlik, Yildirimhan & Senlik, 2015). Além disto, mesmo em casos de infeção subclínica a eficácia de voo e caça das rapinas pode ser afetada, diminuindo o seu fitness (valor adaptativo) (Tezel *et al.*, 2015).

A patogenicidade das infeções helmínticas em aves selvagens ainda se encontra em estudo, existindo poucas evidências de efeitos adversos em aves saudáveis. Muitas das vezes, encontram-se infeções por helmintes associadas a parasitismo múltiplo, o que também

dificulta a atribuição de causalidade dos sinais clínicos a uma única espécie (McLaughlin, 2008). Num estudo efetuado por Santoro, Tripepi, Kinsella, Panebianco & Mattiucci (2010), atribuíram-se alterações patológicas à presença de helmintes em 81 de 110 aves de rapina parasitadas analisadas. Atribuiu-se também a mortalidade à parasitose em 22 destes casos.

Dentro das classes referidas anteriormente, os tremátodes, Platyhelminthes da subclasse Digenea, são os que têm maior relevância em parasitologia de aves selvagens. Encontram-se em todas as classes de vertebrados e conhecem-se 536 espécies que afetam aves, com maior ênfase naquelas com hábitos aquáticos, sendo a especificidade de hospedeiros irregular na sua diversidade (Huffman, 2008; Goater *et al.*, 2014). São o segundo grupo mais comum, após os nemátodes (Redig & Ackermann, 2000).

A sua presença depende da dos HI invertebrados, que depende de fatores ambientais, significando que a sua distribuição é tão vasta quanto a dos hospedeiros, sendo influenciada pelos hábitos migratórios de certas aves (Huffman, 2008).

São parasitas com um corpo achatado dorso-ventralmente, trato digestivo simples e ventosas de fixação (uma na extremidade anterior e outra na posterior). Os seus ovos têm uma cápsula operculada e, ao contrário dos nemátodes nos quais um ovo origina um adulto apenas, podem originar centenas (Krone, 2007; Taylor *et al.*, 2007).

Todos os que afetam aves de rapina são hermafroditas e o seu ciclo de vida heteroxeno contém geralmente três hospedeiros obrigatórios (Krone & Cooper, 2002; Krone, 2007). O desenvolvimento assexuado decorre normalmente em dois HI (respectivamente, gastrópodes aquáticos e gastrópodes aquáticos, anfíbios e peixes) e o HD (aves) é infetado por ingestão de metacercárias enquistadas no corpo destes hospedeiros (Zucca & Delogu, 2007b; Huffman, 2008). No entanto, os seus ciclos de vida são complexos existindo espécies que utilizam dois e mesmo quatro hospedeiros obrigatórios (Goater *et al.*, 2014).

Um dos ciclos de vida mais complexos é o de *Strigea falconispalumbi* que utiliza obrigatoriamente quatro hospedeiros e afeta *B. buteo*. Quando os ovos operculados entram em contacto com água, o opérculo existente numa das extremidades abre-se, libertando o miracídio que penetra o primeiro HI, neste caso um molusco gastrópode aquático, no qual se dá a reprodução assexuada durante a qual perde os cílios e passa por dois ciclos de esporogonia, originando a cercária. De seguida infeta um girino cujo desenvolvimento é simultâneo ao do parasita culminando na ingestão da mesocercária por um terceiro HI, que pode ser qualquer vertebrado, no qual se converte em metacercária. Por fim, após a ingestão deste HI pelo HD (ave de rapina), os adultos depositam ovos que são eliminados nas fezes (Smith, 1996; Krone & Cooper, 2002; Krone, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Huffman, 2008).

A localização do parasita é geralmente no intestino, mas pode encontrar-se nos sacos aéreos, cloaca, pele, fígado e rins (Zucca & Delogu, 2007b; Huffman, 2008).

As espécies de Tremátode mais frequentes em aves são as pertencentes aos géneros *Strigea* e *Neodiplostomum* (Krone & Cooper, 2002), porém foram já descritas infeções por tremátodes dicrocelídeos, com localização hepática (Lacina & Bird, 2000).

De acordo com um estudo levado a cabo por Ferrer *et al.* (2004), em Espanha os tremátodes mais prevalentes em rapinas diurnas são *Neodiplostomum* spp. e *S. falconispalumbi*, e em rapinas noturnas *Brachylaima* spp. e *Neodiplostomum* spp., Sanmartín *et al.* (2004) encontraram também *S. falconis* e *N. attenuatum*.

A sua patogenicidade é raramente descrita, sendo que nos casos em que se verifica os hospedeiros apresentam emaciação, diarreia e enterite grave, podendo chegar a ocorrer invaginação do intestino e síndromes de morte aguda (Regid & Ackermann, 2000; Krone & Cooper, 2002). Num estudo levado a cabo por Santoro *et al.* (2010), mencionam a existência de diarreia, distensão abdominal e duodenite em cinco exemplares de Gavião (*A. nissus*), dois de Bútio-comum (*B. buteo*) e um de Águia-sapeira (*C. aeruginosus*) parasitados por *Neodiplostomum* spp., um de Bútio-vespeiro (*Pernis apivorus*) parasitado por *Strigea falconis* e um outro de Águia-sapeira (*C. aeruginosus*) parasitado por *Parastrigea intermedia*.

Os céstodes, outra classe de Platyhelminthes (Cestoda), encontram-se em aves com prevalências muito elevadas, estando descrita uma variedade de espécies nas mesmas superior a qualquer outro vertebrado. Conhecem-se perto de 1700 espécies, divididas nas ordens Cyclophyllidea, Tetrabothriidea, Diphyllbothriidea e Bothriocephalidea (sendo as duas últimas correspondentes à antiga ordem Pseudophyllidea), das quais a maior parte aparenta ter especificidade para as aves. No entanto, não são particularmente comuns em aves de rapina. As ordens com maior representação em rapinas são a Cyclophyllidea e a Diphyllbothriidea (Smith, 1996; Lacina & Bird, 2000; Kutcha *et al.*, 2008; McLaughlin, 2008).

A maior parte das espécies de interesse encontra-se na ordem Cyclophyllidea, nos géneros *Anomotaenia*, *Choanotaenia*, *Cladotaenia*, *Hymenolepis*, *Idiogenes*, *Matabelea*, *Mesocestoides*, *Oligorchis*, *Paracladotaenia*, *Paradilepis*, *Paruterina* e *Raillietina* (Smith, 1996; Krone & Cooper, 2002). Em Espanha foram identificados *Cladotaenia* spp. e *Raillietina* spp. por Ferrer *et al.* (2004) e *Cladotaenia globifera* por Sanmartín, Alvarez, Barreiro & Leiro (2004).

Estes parasitas caracterizam-se por ter um corpo em forma de fita, segmentado. A morfologia de um parasita adulto pode ser dividida em escólex (onde se encontram os órgãos de fixação), um pescoço não segmentado e estróbilo (cadeia de segmentos denominados proglotes) que quando maturo se divide em três áreas. A primeira (posterior ao escólex) com

proglotes imaturos, seguida de uma com proglotes sexualmente maduros e por fim, a zona final cujas proglotes contém ovos prontos a ser libertados. Estes ovos consistem numa oncosfera com três pares de ganchos (embrião hexacanto) rodeada por uma ou duas membranas frágeis (McLaughlin, 2008). Os órgãos de fixação do escólex são constituídos por quatro ventosas, podem conter ganchos e não possuem um sistema digestivo aberto já que o tegumento absorve os nutrientes (Taylor *et al.*, 2007; Bowman, 2009).

O seu ciclo de vida é indireto e idêntico dentro das famílias. Os segmentos e/ou os ovos são eliminados nas fezes, ingeridos por um HI e dentro do seu aparelho gastrointestinal, por ação do suco gástrico, a oncosfera é libertada, penetrando na mucosa e logo nos vasos sanguíneos ou linfáticos. De seguida, perde os ganchos e transforma-se numa larva cisticercoide, infetante para o HD por ingestão do HI. Dentro do HD ocorre digestão do corpo da larva até restar apenas o escólex e o pescoço não segmentado, a partir do qual se forma o estróbilo (Krone & Cooper, 2002; Taylor *et al.*, 2007; McLaughlin, 2008; Bowman, 2009).

Poderá ser necessária a passagem por um segundo HI antes da ingestão pelo HD para que o ciclo seja completo. Os parasitas são geralmente observados no intestino das aves, fixos à parede intestinal pelo escólex, podendo parasitar também o ceco e a moela (Smith, 1996; Krone & Cooper, 2002; Zucca & Delogu, 2007b; McLaughlin, 2008).

Não existem muitos registos de patogenicidade dos céstodes em aves, sendo esta considerada desprezível, no entanto existe uma aparente relação entre baixa condição corporal e números elevados de parasitas. Em infeções muito grandes, poderá ocorrer obstrução intestinal, espessamento da mucosa e enterite. Os metabolitos do parasita podem também causar irritação da mucosa intestinal. Os sinais clínicos variam, de diarreia, desidratação e debilidade até morte aguda (Krone & Cooper, 2002).

Num estudo conduzido por Santoro *et al.* (2010), foi associada caquexia e obstrução duodenal parcial a infeção por *Cladotaenia* sp. numa Águia-sapeira (*C. aeruginosus*).

Um outro filo de helmintes, os acantocéfalos (Acantocephala), é constituído por parasitas intestinais obrigatórios. Conhecem-se cerca de 400 espécies que parasitam aves, estando aparentemente limitados a algumas ordens e tendo particular prevalência em Anseriformes. O género mais relatado na Europa é *Centrorhynchus*. (Krone & Cooper, 2002; Taylor *et al.*, 2007a; Richardson & Nickol, 2008).

Encontram-se adaptados ao meio exclusivamente intestinal, não possuindo aparelho digestivo e absorvendo os nutrientes através do tegumento (que muitas vezes apresenta invaginações e dobras). O seu corpo é biseccionado possuindo uma probóscide retrátil munida de espinhos, através da qual se fixa ao hospedeiro, e um corpo denominado tronco (Krone & Cooper, 2002; Richardson & Nickol, 2008; Bowman, 2009).

Existe dimorfismo sexual, sendo as fêmeas de tamanho superior aos machos, da mesma forma que se verifica em nemátodes (Taylor *et al.*, 2007; Bowman, 2009).

O seu ciclo de vida é indireto e inicia-se com a eliminação de ovos pela fêmea adulta. Estes são excretados pelo HD (geralmente aves, mas pode pertencer a qualquer classe de vertebrado) e são ingeridos pelo HI (artrópode) dentro do qual eclodem, penetrando a mucosa do canal alimentar e alojando-se no hemocélio do mesmo. Após diferenciação e enquistamento, o parasita torna-se num cisticanto, forma infetante para o HD. Os HD infetam-se por ingestão de um HI artrópode (insetos das ordens Coleoptera e Orthoptera) e o cisticanto, após libertação no intestino, fixa-se à parede intestinal e cresce até atingir a maturidade (Krone & Cooper, 2002; Taylor *et al.*, 2007; Richardson & Nickol, 2008; Bowman, 2009).

Caso um invertebrado infetado seja ingerido por outro vertebrado, como no caso de peixes, anfíbios ou répteis, o cisticanto tem a capacidade de reenquistar nos seus órgãos viscerais, podendo assim estes funcionar como hospedeiro paraténico (HP) (Richardson & Nickol, 2008; Bowman, 2009).

Quanto à sua patogenicidade existe pouca informação, no entanto, geralmente encontra-se limitada a inflamação local onde o parasita se fixa à mucosa. Sabe-se que em casos de infeções graves, com números elevados de parasitas, estes podem levar a perfuração do intestino, consequente peritonite e eventual morte (Smith, 1996).

Um estudo levado a cabo por Santoro *et al.* (2010) em aves selvagens relata inflamação da mucosa e serosa (diagnosticada por observação da infiltração de macrófagos e heterófilos) nos locais de fixação dos parasitas. Outros estudos relatam sintomatologia gastrointestinal, como caquexia, diarreia, enterite, obstrução e invaginação intestinal, associados a infeções elevadas (Tezel *et al.*, 2015).

Por outro lado, encontram-se descritos casos de infeção por número elevado de parasitas, sem se observar relação com a mortalidade dos hospedeiros (Lacina & Bird, 2000).

Por último, o grupo dos nemátodes, filo Nematoda, é o mais diversificado grupo de animais multicelulares e são considerados por esta razão um dos mais importantes grupos de helmintes em aves. O local de desenvolvimento destes no hospedeiro varia muito também, sendo mais comuns no trato gastrointestinal e respiratório (Smith, 1996; Krone & Cooper, 2002; Zucca & Delogu, 2007; Goater *et al.*, 2014).

Possuem um corpo alongado e cilíndrico, afunilado em ambas as extremidades e coberto por uma cutícula transparente, cujo tamanho varia. O seu sistema digestivo é completo e tubular, a boca que pode ser simples, rodeada por dois ou três lábios e comunicando diretamente com o esófago, ou mais complexa, munida de cápsula bucal

podendo ter dentes. Apresentam, à semelhança dos acantocéfalos, dimorfismo sexual (Taylor *et al.*, 2007; Zucca & Delogu, 2007; Bowman, 2009; Goater *et al.*, 2014).

O seu ciclo de vida é geralmente heteroxeno, mas em alguns casos (como *Syngamus* spp.) pode ser direto (Anderson, 2000).

Este filo divide-se em várias ordens, das quais as mais relevantes em aves selvagens são: Ascaridida (englobando as Famílias Ascarididae e Anisakidae), Spirurida (englobando as Famílias Physalopteroidae, Acuariidae, Habronematidae, Diplostriaenidae e Tetrameridae), Enoplida (Família Trichuridae) e Strongylida (Família Syngamidae).

Dentro da ordem Ascaridida, os nemátodes da família *Ascarididae* caracterizam-se pelas suas grandes dimensões, boca possuindo três lábios, verdadeiros interlábios e linha denticulada, bem como ausência de apêndice ventricular. Existe dimorfismo, como mencionado, neste caso manifestado nas espículas curtas do macho (Yamaguti, 1961; Fagerholm & Overstreet, 2008).

Os Ascarídeos mais importantes em aves são os do género *Porrocaecum*, sendo as espécies mais frequentes *P. angusticole* e *P. depressum* (Krone & Cooper, 2002; Fagerholm & Overstreet, 2008). A distinção entre espécies é feita pela observação das projeções bucais e presença ou não de asas cervicais (Fagerholm & Overstreet, 2008).

O seu ciclo de vida é indireto, iniciando-se com a excreção fecal dos ovos pelo HD (aves), que são ingeridos pelo HI (anelídeos ou insetos). Após eclosão, as larvas L2 invadem o sistema circulatório e transformam-se em L3, que por sua vez infeta o HD aquando da ingestão do HI. Caso o HI seja ingerido por um pequeno mamífero, este servirá de HP já que as larvas L3 se enquistam no seu trato intestinal e podem infetar um HD (Anderson, 2000; Fagerholm & Overstreet, 2008; Fagerholm & Robin, 2008; Gibbons, 2010).

Não existem muitos registos de patogenicidade destes parasitas, estando restritos a infeções em juvenis e animais imunodeprimidos ou infeções muito graves que poderão causar obstrução intestinal. *Porrocaecum* spp. são achados frequente em necrópsia de aves caquéticas. Sabe-se também que os produtos metabólicos do mesmo são tóxicos para o HD (Smith, 1996; Lacina & Bird, 2000; Krone & Cooper, 2002).

Já a família Anisakidae possui uma boca com três lábios, também, e pode ser identificada pelos interlábios bem desenvolvidos, ausência de linha denticulada e presença de apêndice ventricular (Yamaguti, 1961).

Dos Anisakídeos, o mais relevante em aves é *Contracaecum*, geralmente identificado em animais piscívoros (Smith, 1996; Redig & Ackermann, 2000).

O ciclo de vida é aquático, iniciando-se com a ingestão dos ovos pelo HI (crustáceos, peixes) que por sua vez pode ser ingerido por um HP (peixe). O HD (aves) infeta-se por

ingestão dos HI ou HP, ficando o parasita fixo à parede do proventrículo ou intestino até atingir a maturidade. Por vezes existe transmissão direta para as crias durante a alimentação das mesmas pelos pais (Anderson, 2000; Fagerholm & Overstreet, 2008; Gibbons, 2010).

A patogenicidade destes parasitas é reduzida e rara, observando-se normalmente apenas anorexia e, por vezes, lesões ulcerativas nos locais de fixação, que podem levar a anemia (Fagerholm & Overstreet, 2002).

Dentro da ordem Spirurida, os parasitas da família Physalopteroidae que afetam aves selvagens encontram-se pouco estudados. Identificam-se por possuir um colar cefálico constituído por uma projeção da cutícula sobre os lábios. Do género *Physaloptera*, a espécie mais comum é *P. alata* (Yamaguti, 1961; Krone & Cooper, 2002; Zucca & Delogu, 2007).

Desconhece-se o seu ciclo de vida, sabendo-se apenas que utiliza insetos como HI e que a localização mais comum é no TGI, fixos à mucosa do esófago e proventrículo na qual podem causar alguma inflamação (Smith, 1996; Anderson, 2000; Krone & Cooper, 2002).

A família Acuariidae é identificada pela presença de cordões cuticulares anastomosados na porção anterior do corpo, utilizados para aderir à mucosa do hospedeiro. O género mais importante em aves é o *Synhimantus*, um parasita frequentemente encontrado no TGI superior (Yamaguti, 1961; Krone & Cooper, 2002). Existe ainda a distinção entre estes e o subgénero *Dispharynx*, pela ausência de anastomose nos cordões e localização mais comum no proventrículo, que tem maior prevalência em Galiformes e Passeriformes (Fagerholm, 1996; Carreno, 2008; Anderson *et al.*, 2009).

O seu ciclo de vida é indireto, utilizando insetos (ou, no caso de *Dispharynx* spp., isópodes terrestres) enquanto HI nos quais a larva L3 se desenvolve e, ocasionalmente, répteis como HP (Anderson, 2000; Perera *et al.*, 2012).

A única patologia relatada para este grupo de parasitas consiste na obstrução do TGI devido a inflamação e lesão tissular (Krone & Cooper, 2002; Carreno, 2008).

A família Habronematidae caracteriza-se pela presença de dois lábios laterais bem desenvolvidos, possuindo processos dentiformes internos. O género *Cyrnea* é frequentemente encontrado no proventrículo de aves. Quando se verifica a inserção dos dentes no bordo posterior dos lábios, estamos na presença de uma parasita do subgénero *Cyrnea*, enquanto que caso estes se insiram no bordo anterior o parasita será do género *Procyrnea*. Alguns autores consideram-nos géneros isolados (Yamaguti, 1961; Anderson *et al.* 2009).

O seu ciclo de vida é indireto, utilizando grilos ou gafanhotos como HI. O desenvolvimento da larva até ao estadio L3 dá-se no hemocélio deste e o HD infeta-se por ingestão dos HI (Anderson, 2000).

Como no caso do género *Synhimantus*, causam problemas apenas quando em grandes quantidades (Krone & Cooper, 2002).

A família Tetrameridae apresenta um forte dimorfismo entre sexos, sendo os machos filiformes e as fêmeas de tamanho superior em espiral. Geralmente, os machos são encontrados livres ou fixos à mucosa do proventrículo e as fêmeas fixas nas glândulas gástricas (Anderson, 2000; Kinsella & Forrester, 2008). Inclui o género *Microtetrameres*, cujo ciclo de vida se inicia com a ingestão do ovo pelos HI (insetos ou isópodes terrestres) dentro dos quais a larva L1 penetra o hemocélio onde matura até ao estágio infetante L3. A ingestão do HI pelos HD (Accipitriformes, Passeriformes e Strigiformes, entre outras aves) leva a infeção do mesmo (Anderson 2000; Krone & Cooper 2002).

A informação disponível acerca da patogenicidade deste parasita advém de estudos histopatológicos. Nestes, verifica-se degenerescência das glândulas gástricas por ação mecânica e hematófaga dos parasitas. Apesar de existir um possível aumento compensatório da secreção, a pressão exercida pela presença das fêmeas pode levar a perda de função (Kinsella & Forrester, 2008).

Ainda dentro da ordem Spirurida, concretamente na família Diplostriaenidae, encontramos o género *Serratospiculum*, frequentemente encontrado nos sacos aéreos de rapinas diurnas. Apesar de se tratar de um nemátode do aparelho respiratório e não gastrointestinal, como os seus ovos se podem encontrar nas fezes acaba por ser relevante para este trabalho. O seu ciclo de vida processa-se no HD após ingestão do HI infetado (insetos), sendo que as suas larvas penetram os sacos aéreos através do fígado e maturam até porem ovos no trato respiratório superior que são deglutidos e excretados por via fecal (Krone & Cooper, 2002).

Passando agora à Ordem Enoplida, estes parasitas são de reduzidas dimensões e o seu esófago é característico, dividindo-se numa zona muscular anterior e numa zona glandular posterior mais longa, o esticossoma, formada por esticócitos (células glandulares). Os seus ovos são bioperculados e de superfície texturada (Yabsley, 2008).

Inclui grupos de parasitas muito diversos e complexos a nível de organização taxonómica das famílias e subfamílias, sendo que alguns géneros e mesmo espécies têm vindo a ser reclassificados e divididos. São considerados os nematodes mais frequentemente observados em aves e uma das espécies mais frequentemente encontrada é *Eucoleus dispar*. Este nematode, frequentemente encontrado no TGI superior, vê-se referenciado por alguns autores como *Capillaria contorta* ou mesmo *Eucoleus contortus*. Existe divergência acerca da sua classificação, existindo quem creia que o primeiro afeta aves terrestres e o último aves

aquáticas, bem como quem afirme que ambos afetam os dois tipos de ave (Gibbons, 2010; Krone & Cooper, 2002; Yabsley, 2008).

As espécies *Capillaria tenuissima* e *Baruscapillaria falconis* encontram-se geralmente no intestino e raramente causam sintomatologia, embora anorexia e diarreia sejam relevantes quando em número elevado (Krone & Cooper, 2002; Smith, 1996).

O seu ciclo de vida tanto pode ser direto como indireto utilizando anelídeos como HI e anelídeos ou roedores, no caso dos capilarídeos intestinais, como HP (Smith, 1996; Krone & Cooper, 2002; Yabsley, 2008).

Quanto à patogenicidade as suas lesões são variáveis, podendo causar infecções assintomáticas, inflamação e edema no local da fixação ou mesmo membranas diftéricas semelhantes às causadas por *Trichomonas* spp. (Krone & Cooper, 2002; Smith, 1996).

Na ordem Strongylida temos, mais uma vez, nemátodes que parasitam o aparelho respiratório superior apesar de terem também fases intestinais. Exemplo destes são os géneros *Syngamus* (por exemplo, *Syngamus trachea*) e *Cyathostoma*, da família *Syngamidae*. O seu ciclo de vida pode ser direto ou utilizando invertebrados como HP. A migração no HD faz-se de forma semelhante à descrita para *Serratospiculum* spp., observando-se também casos de migração direta para o pulmão através da parede intestinal (Krone & Cooper, 2002; Fernando & Barta, 2008).

O diagnóstico de infeção por helmintes em animais vivos é geralmente realizado por observação de formas parasitárias nas fezes após métodos coprológicos qualitativos como a flutuação (onde se observam ovos de nemátodes e céstodes, bem como proglotes dos últimos) e a sedimentação (ovos de tremátodes e alguns céstodes). A identificação é efetuada por observação de características morfológicas dos mesmos, o que nem sempre permite um diagnóstico específico. Existe ainda a questão do período patente para cada espécie, fora do qual pode não ocorrer excreção de formas parasitárias nas fezes, sendo aconselhável a realização de colheitas e testes repetidos durante três dias consecutivos ou interpolados (Férrandez et al., 1999; Zucca & Delogu, 2007).

Formas parasitárias podem também ser encontradas em necrópsia, após análise cuidada do TGI e colheita. Geralmente a identificação pode ser efetuada também por exame direto das características morfológicas, no entanto em alguns casos é necessário processamento adicional das amostras. Nos nemátodes e acantocéfalos para observar a estrutura interna é necessária exposição a lactofenol como solução esclarecedora, já para os tremátodes e céstodes é necessário utilizar o método de coloração em massa com carmim álcool-clorídrico (Krone & Cooper, 2002; Krone, 2007; Zucca & Delogu, 2007).

3. Desenvolvimento do trabalho

3.1. Objetivos

No sentido de contribuir para o conhecimento da fauna parasitológica de aves silvestres, dos fatores que a influenciam e, principalmente, dos indicadores de parasitose existentes no hemograma de aves silvestres, foi efetuada pesquisa de parasitas e identificação das formas parasitárias encontradas (tanto gastrointestinais como hemáticas), atendendo à sua localização e prevalência no animal, e determinação dos parâmetros correspondentes ao hemograma nos indivíduos analisados.

Pretendeu-se ainda determinar se existem relações entre os parâmetros hematológicos considerados relevantes para este estudo e a espécie, localização e prevalência dos parasitas, bem como a influência de fatores como a causa de ingresso ou a ordem, fenologia e conduta social dos animais, resumidas nos grupos funcionais em que estão incluídas, nas características do parasitismo.

3.2. Material e métodos

Entre os meses de janeiro e maio de 2015, foram colhidas amostras sanguíneas e fecais de 40 aves que ingressaram no hospital de fauna selvagem do GREFA em Madrid, Espanha (40° 28'06,37 N, 3° 50'25,87 O). Este estudo incluiu aves em recuperação admitidas no Hospital de fauna selvagem, provenientes da Comunidade de Madrid e pertencentes a 19 espécies diferentes. Foram selecionadas principalmente aves de rapina, mas também foram incluídas aves de espécies interessantes do ponto de vista parasitológico (por exemplo, aquáticas) (Ver Anexo IX – protocolo de colheita de amostras).

As espécies foram distribuídas por grupos funcionais conforme as suas características ecológicas, alimentares, sociais, migratórias e taxonómicas, que podem ser consultadas na Tabela 5. Assim, os grupos funcionais considerados são:

1. Aves de rapina de hábitos noturnos: *Asio flammeus*, *Tyto alba*, *Strix aluco*, *Asio otus* e *Bubo bubo*.
2. Aves de rapina diurnas que se alimentem de pequenos mamíferos terrestres: *Falco columbarius*, *Falco tinnunculus*, *Falco naumanni* e *Buteo buteo*.
3. Aves de rapina diurnas de hábitos necrófagos: *Aegypius monachus*, *Gyps fulvus* e *Milvus migrans*.
4. Aves de rapina diurna que se alimentem de outras aves: *Accipiter gentilis*, *Accipiter nisus*, *Circus aeruginosus* e *Aquila fasciata*.
5. Aves de meio aquático: *Phalacrocorax carbo* e *Gallinula chloropus*.
6. Aves estepárias: *Burhinus* *oedicnemus*.

Tabela 5 – Ecologia das espécies de ave estudadas (ICNF, s.d.; Snow, Perrins & Gilmour, 1998; Madroño *et al.*, 2004) – Fotos gentilmente cedidas por Nuno Santos Ramos.







Espécie	Alimentação	Habitat	Hábitos sociais e movimentos	Fotografias
Abutre-preto <i>Aegypius monachus</i>	Necrófago (tecidos moles, pele, tendão); mamíferos de médio e grande porte. Muito raramente caça presas lentas, pequenas ou debilitadas. Período diurno.	Movimenta-se por áreas extensas e remotas com encostas íngremes. Prefere terrenos abertos para a busca de alimento Localização e movimentos dependem da disponibilidade de alimento.	Residente, dispersão de juvenis. Menos gregário que <i>G. fulvus</i> durante o ano. Solitário ou em casal, exceto quando há abundância de alimento. Nidifica sozinho ou em colónias dispersas e desorganizadas.	
Grifo <i>Gyps fulvus</i>	Necrófago (tecidos moles); mamíferos de porte pequeno e médio. Período diurno.	Evita condições climáticas extremas, preferindo escarpas íngremes próximas de pastagens, em clima moderado. Localização e movimentos dependem da disponibilidade de alimento.	Residente, parcialmente migrador (juvenis). Maior população em Espanha, maioritariamente residente. Solitário e gregário, conforme fatores. Procura comida individualmente, mas tende a seguir outras aves para a localizar. Agrupa onde existe alimento. Faz colónias com ninhos dispersos, mas próximos.	
Açor <i>Accipiter gentilis</i>	Mamíferos (coelho, esquilo) e aves de pequeno e médio porte (perdiz, faisão, gralha). Oportunista, dieta varia conforme disponibilidade. Período diurno.	Áreas arborizadas (florestas de coníferas) isoladas. Ocasionalmente aproxima-se de pequenas urbanizações, atraído pela disponibilidade de presas.	Residente, dispersão juvenil. Solitário fora do território de nidificação (onde pode existir um par), especialmente quando caça. Ninhos muito afastados entre si.	
Gavião <i>Accipiter nisus</i>	Preda quase só aves (pequeno/médio porte, adultos e crias voadoras) e muito raramente pequenos mamíferos. Período diurno.	Áreas arborizadas em climas temperados. Prefere florestas (coníferas) densas e isoladas, com áreas mais abertas (orla) para a caça.	Populações a Norte migram no inverno, com dispersão. Solitário fora do território e época de nidificação. Caça sozinho, podendo ocorrer partilha da área de caça em períodos diferentes do dia. Grande distância entre ninhos	
Águia de Bonelli <i>Aquila fasciata</i>	Aves e mamíferos de porte médio. Comportamento necrófago oportunista ocasional. Período diurno.	Zonas quentes e relativamente secas, agrupamentos rochosos perto de florestas pouco densas. Nidifica em pontos de vantagem (escarpas ou árvores). Fora da época reprodutiva, habita sapais e terrenos baixos.	Residente, com dispersão. Comportamento solitário. Geralmente solitário na caça, mas pode fazê-lo em par. Muito territorial durante a época de cria, porém tolera imaturos.	
Búteo-comum <i>Buteo buteo</i>	Essencialmente pequenos mamíferos, ocasionalmente aves, répteis e anfíbios. Raramente necrófago oportunista, adapta-se à disponibilidade de alimento. Período diurno.	Clima temperado, evita regiões áridas. Prefere florestas pouco densas, com proximidade de água ou terrenos alagados (agrícolas) e muitos poisos; caça em áreas abertas com vegetação rasa.	Residente, migrador ocasional. Migra individualmente, podendo também organizar-se em pequenos bandos que convergem no solo em grandes concentrações. Solitário ou em pares. Caça sozinho. Territorial.	

Tabela 5 – Ecologia das espécies de ave estudadas (cont.) (ICNF, s.d.; Snow, Perrins & Gilmour, 1998; Madroño *et al.*, 2004)










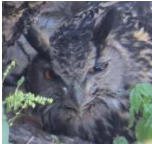



Milhafre-preto <i>Milvus migrans</i>	Predador e oportunista, a alimentação varia conforme a disponibilidade. Pequenas aves e ocasionalmente cadáveres de aves e pequenos mamíferos. Período diurno.	Estepes, zonas resguardadas. Evita regiões extremas quanto à temperatura e vento. Preferência por proximidade de água. Muitas vezes próximo de povoadamentos humanos.	Migrador com população residente e dispersão. Migra individualmente, mas por vezes observam-se bandos dispersos. Sociável, especialmente fora do seu território e da época de cria. Grandes concentrações onde abunda alimento.	
Águia-sapeira <i>Circus aeruginosus</i>	Animais terrestres e de sapal, grande variedade de porte e espécie. Principalmente aves (adultos) e pequenos mamíferos (roedores). Oportunista e necrófaga. Período diurno.	Climas temperados, evita terrenos montanhosos ou muito arborizados. Prefere lagoas, albufeiras ou terrenos alagados com muita vegetação aquática (ex.: caniçal) e poucas árvores dispersas.	Migrador, alguma população residente e dispersão. Migra individualmente, organizando-se em pequenos bandos que convergem no solo em grandes concentrações. Solitário fora da época de acasalamento. Caça só, exceto onde abunda alimento.	
Esmerilhão <i>Falco columbarius</i>	Principalmente pequenas aves, mas também mamíferos. Período diurno.	Evita florestas densas e escarpas rochosas, preferindo terrenos planos extensos próximos de água. Pode nidificar em árvores, mas prefere pontos mais altos.	Migrador com alguma população residente. Migra individualmente, podendo observar-se pares ou grupos dispersos. Solitário fora da época de reprodução; territorial durante a mesma.	
Peneireiro-comum <i>Falco tinnunculus</i>	Pequenos mamíferos e por vezes aves. Adaptável e oportunista, por vezes alimenta-se de insetos e répteis. Período diurno, pode chegar a crepuscular.	Territórios com zonas abertas para a caça (estradas, terrenos agrícolas, pastagens). Aproxima-se muito de povoadamentos, podendo mesmo nidificar em estruturas abandonadas.	Residente, parcialmente migrador, com dispersão. Gregário durante a migração. Solitário fora da época de reprodução, ocasionalmente em pares. É raro nidificar em colónia.	
Francelho <i>Falco naumanni</i>	Predominantemente pequenos insetos e mamíferos, mas também aves e répteis. Predador oportunista, aproveita abundâncias locais. Período diurno.	Zonas abertas, com abundância de presas (produção agrícola extensiva). Caça em pousios e pastagens com vegetação baixa. Ninhos em estruturas abandonadas ou áreas rochosas, perto de povoadamentos.	Migrador, alguns residentes no Sul de Espanha. Bandos grandes e dispersos que agrupam no solo. Gregário, congrega em grupos que podem chegar aos 100 indivíduos. Nidifica em colónias de até 500 pares.	
Coruja-do-nabal <i>Asio flammeus</i>	Caça pequenos mamíferos (roedores) e, mais raramente, aves durante o período crepuscular e noturno.	Zonas húmidas em áreas abertas, dormitórios no solo resguardados em moitas perto de campos agrícolas ou sapais. Dependente da abundância de pequenos roedores. Afastado de humanos.	Migrador nomádico. Pode formar pequenos bandos durante migração com <i>Asio otus</i> , e agrupar onde abunda alimento. Territorial solitário ou em casal durante época reprodutiva.	

Tabela 5 – Ecologia das espécies de ave estudadas (cont.) (ICNF, s.d.; Snow, Perrins & Gilmour, 1998; Madroño *et al.*, 2004)

Bufo-pequeno <i>Asio otus</i>	Principalmente pequenos roedores, algumas aves e mamíferos maiores. Período noturno (diurno só durante cria).	Zonas abertas com vegetação baixa e presas abundantes, perto de cobertura ampla (florestas de coníferas). Aproveita-se de ninhos de outras espécies.	Maioritariamente residente (Sul da Europa) com dispersão juvenil. Muitas vezes agrupa-se em colónias durante o outono/inverno. Fora destas é solitário ou vive em casal.	
Coruja-do-mato <i>Strix aluco</i>	Maior variedade de presas que outras corujas de porte igual. Em floresta pequenos roedores, mas também mamíferos maiores, aves, répteis e anfíbios; em ambiente urbano aves. Período crepuscular e noturno (diurno só durante cria).	Floresta decíduas ou mistas, terrenos agrícolas com árvores dispersas, parques e até estruturas humanas abandonadas. Habitat necessita de estrutura rica, com muitos poisos, árvores, áreas abertas para a caça e proximidade de água.	Residente, adultos reprodutores sedentários e territoriais. Dispersão de juvenis. Solitário ou em pares durante o ano.	
Coruja-das-torres <i>Tyto alba</i>	Pequenos mamíferos (roedores) e por vezes aves e anfíbios, conforme disponibilidade. Período crepuscular e noturno.	Terrenos abertos não desprovidos de árvores, agrícolas com vegetação baixa e zonas abertas para caçar. Perto de povoamentos, nidificando por vezes em ruínas.	Residente, com dispersão de juvenis. Solitário fora da época de reprodução ou em casal. Territorial. Caça individual.	
Bufo-real <i>Bubo bubo</i>	Mamíferos e aves de pequeno a médio porte. Período noturno.	Locais isolados e selvagens, sem interferência humana. Nidifica em plataformas rochosas e grutas, próximo de água. Dependente de disponibilidade de alimento.	Residente, comportamento nomádico considerável em regiões com climas frios. Solitário, casais sedentários e fortemente territoriais durante todo o ano.	
Corvo-marinho <i>Phalacrocorax carbo</i>	Dieta totalmente composta por peixe apanhado em mergulhos diurnos.	Aquáticos, água doce e salgada. Junto da costa do Oeste da Europa. Corpos de água não muito profunda, lagos, barragens, lagoas, pântanos e estuário.	Migrador, comportamento dispersivo. Gregário fora da época de reprodução e dependendo da abundância de alimento pode formar bandos.	
Galinha-d'água <i>Gallinula chloropus</i>	Omnívoro, quantidades iguais de matéria vegetal e animal. Alimenta-se na água, por vezes por filtração ou mergulho. Período diurno.	Tolera condições variáveis de temperatura e humidade, sendo sensível ao frio. Necessita de acesso a corpos de água doce, com plantas aquáticas. Nidifica em árvores perto da água.	Residente, com dispersão. Em pares ou grupos familiares, é dispersamente gregário fora da época reprodutiva. Agrupa-se onde abunda alimento. Ninhos separados, territorial.	
Alcaravão <i>Burhinus oedinemus</i>	Invertebrados terrestres e pequenos vertebrados. Período crepuscular e noturno.	Evita terrenos acidentados e arborizados. Prefere terrenos áridos, planos e abertos que permitam corrida, perto de zonas com água (ex.: agrícolas, sapais).	Residente, parcialmente migrador. Gregário mesmo durante a época reprodutiva (alimentação comunitária). Ninhos separados.	

Cada animal foi avaliado previamente à colheita de amostras, tendo esta sido efetuada apenas no caso de este tolerar a manipulação necessária para o efeito.

Foram excluídos todos os indivíduos que se apresentassem excessivamente débeis, susceptíveis ao stress ou com feridas muito extensas.

Foram ainda excluídos da análise os dados referentes a quatro crias de Bufo-real (*Bufo bufo*) e duas crias de Coruja-do-mato (*Strix aluco*) uma vez que se encontravam em mudas exteriores, impossibilitando a colheita diferenciada de amostras individuais. Os exemplares de Coruja-do-mato eram também demasiado pequenos para a colheita de amostras de sangue. Após esta exclusão, a amostra final para análise de dados foi de 34 indivíduos.

3.2.1. Colheita, armazenamento e processamento de amostras

A colheita de amostra de sangue foi efetuada posicionando o animal em decúbito dorsal, com o auxílio de contenção física e impedimento da visão. A maior parte das amostras foram colhidas a partir da veia ulnar superficial, no entanto em alguns casos utilizou-se a veia metatarsal medial ou a jugular direita, conforme as particularidades anatómicas e condição física do indivíduo.

A quantidade colhida de cada animal foi reduzida, nunca excedendo os 0,4 ml e tendo sempre em conta o peso e estado hígido do animal, e a colheita foi efetuada com seringas de 1 ml e agulhas de 25 (0,5x16 mm) ou 23 gauge (0,6x25 mm) (PIC indolor®, Artsana). Imediatamente após a colheita, foi realizado um esfregaço por escorregamento (ou *wedge smear*, técnica descrita abaixo) e preenchido um tubo de microhematócrito. De seguida foram conservados 0,25 ml num tubo de colheita com EDTA (Valve stopper, Aquisel®), posteriormente conservado a 4°C por um período nunca superior a 48h até à sua análise.

A realização do esfregaço de sangue inteiro, sem anticoagulante, é conseguida a partir de uma gota de sangue, utilizando-se duas lâminas de bordos biselados (Starfrost® - Microscope slides, Germany) mantendo-se horizontal a destinada ao esfregaço e utilizando a segunda num ângulo de 30 a 45° para estender o sangue. A técnica utilizada denomina-se *wedge smear* ou esfregaço por escorregamento e consiste em posicionar o borde biselado da lâmina em frente à gota de sangue, movê-lo para trás até tocar nela, esperar que se espalhe pelo bordo, e mover a lâmina para a frente num movimento contínuo e uniforme. O esfregaço foi então seco ao ar e armazenado para coloração posterior, esta de acordo com a técnica de Wright Giemsa modificada por Jaime Samour (Samour & Pendl, 2009b) (Figura 5).



Figura 5- Técnica de esfregaço por escorregamento ou “wedge smear technique” (Samour, 2009a).

A composição dos reagentes necessários à coloração Wright Giemsa Modificada por Samour e protocolo de coloração encontra-se resumida abaixo (Tabela 6).

Tabela 6 - Reagentes necessários à coloração Wright-Giemsa Modificada (Samour & Pendl, 2009b).

Reagente	Quantidade
Corante Wright (pó) Merck®	0,6 g
Corante Giemsa (pó) Merck®	0,06 g
Glicerol	1 ml
Metanol	200 ml

Para o corante, devem-se misturar os componentes descritos acima, filtrar e armazenar num frasco protegido da luz, onde se mantêm estáveis por mais de um mês.

A preparação do tampão ou *buffer* pH 6,8 segundo Weise faz-se dissolvendo uma pastilha de tampão pH 6,8 (Merck®) num litro de água destilada e agitando o recipiente até à sua dissolução completa. Esta solução mantém-se estável durante um mínimo de um mês.

Para proceder à coloração de esfregaços, estes são colocados num suporte sobre um recipiente, cobrindo-os com o corante durante 3 minutos. De seguida, junta-se uma quantidade igual de solução tampão e mistura-se utilizando a pipeta. Deve-se observar uma película verde metálico à superfície. Após 6 minutos, lavam-se os esfregaços com solução tampão e cobrem-se com a mesma durante um minuto (isto permite uma melhor diferenciação) após o qual se deve lavar mais uma vez, abundantemente, e limpar o corante da parte de trás da lâmina (Samour & Pendl, 2009b).

Depois de secarem, retira-se o excesso de corante passando um pedaço de papel levemente sobre o esfregaço. Para fazer uma preparação permanente, aplica-se meio de montagem e uma lamela e deixa-se secar 12 horas.

A colheita de amostras fecais foi realizada a partir da caixa de transporte, quando presentes ao ingresso, e da jaula de internamento do animal nos dias seguintes. Foram seriadas ao longo de 3 dias consecutivos e teve-se o cuidado de colher amostras frescas, sem contaminação e com o mínimo de uratos possível. O armazenamento de amostras foi efetuado em tubos de colheita secos, posteriormente conservados a 4°C até análise (Tedjo, Jonkers, Savelkoul, Masclee, van Best, Pierik & Penders, 2015).

Em caso de morte de um animal incluído no estudo, foi realizada a necrópsia completa do mesmo, com especial atenção ao trato gastrointestinal e respiratório (Garcês & Pires, 2017). Foram colhidas amostras de sangue e parasitas, bem como de trato intestinal quando se suspeitou de parasitose. A conservação foi efetuada de forma idêntica à das amostras fecais.

3.2.2. Análises hematológicas

Foi efetuada a determinação do hematócrito, a contagem total de eritrócitos e leucócitos, a contagem estimativa total de leucócitos e trombócitos, a contagem diferencial de leucócitos e pesquisa de hemoparasitas.

O hematócrito é determinado por centrifugação dos tubos capilares mencionados na colheita de amostras a 12000 rotações durante 5 minutos e posterior medição da proporção de eritrócitos com ajuda de uma escala como demonstrado na figura 6 (Samour & Pendl, 2009b).

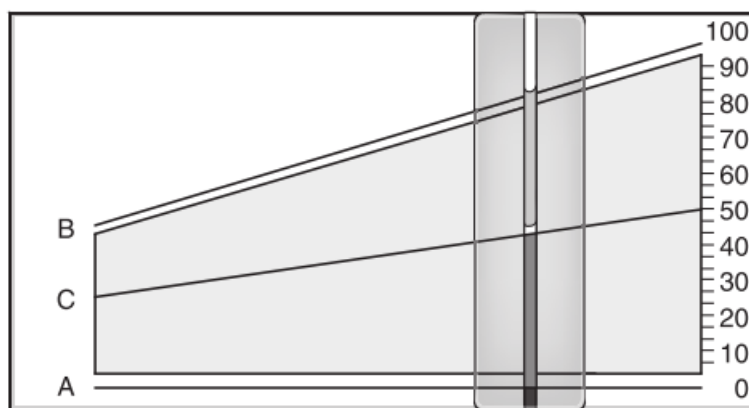


Figura 6- Leitura do hematócrito utilizando escala (Samour, 2015).

A contagem total de eritrócitos (RBCc) e de leucócitos (WBCc) é efetuada num hemocitómetro, a Câmara de Neubauer melhorada (Blaubrand®). A amostra de sangue é diluída com solução de Natt & Herrick na proporção de 1:200 utilizando uma pipeta de Thomas (Blaubrand®) e um pipetador. Enche-se a pipeta de sangue até à marca 0,5 e de solução de Natt & Herrick até à marca 101, após o qual se mistura suavemente o seu conteúdo durante 3 minutos. Prepara-se o hemocitómetro colocando uma lamela sobre o mesmo e, após descartar as primeiras gotas da pipeta (pois contêm muito diluidor), toca-se levemente com esta no bordo da lamela (de ambos os lados) de forma a encher as duas câmaras de forma lenta e homogênea, sem ultrapassar as suas margens. Deve-se deixar repousar a câmara 3 minutos antes de efetuar a contagem (Samour & Pendl, 2009b).

A contagem é efetuada num microscópio óptico binocular utilizando ocular de 10x e objetiva de 40x (ampliação de 400x) no qual se contam, para cálculo de eritrócitos, aqueles que estão presentes nos quatro cantos e quadrado central ou aqueles que se encontram nos cinco quadrados diagonais da zona central da câmara de contagem de forma cuidada,

metódica e aplicando a regra do L para não contar a mesma célula em duplicado (figura 7) (Campbell, 1995; Samour & Pendl, 2009b). Multiplica-se esse valor por 10000 para obter os eritrócitos por microlitro de sangue ou mm^3 (Samour & Pendl, 2009a).

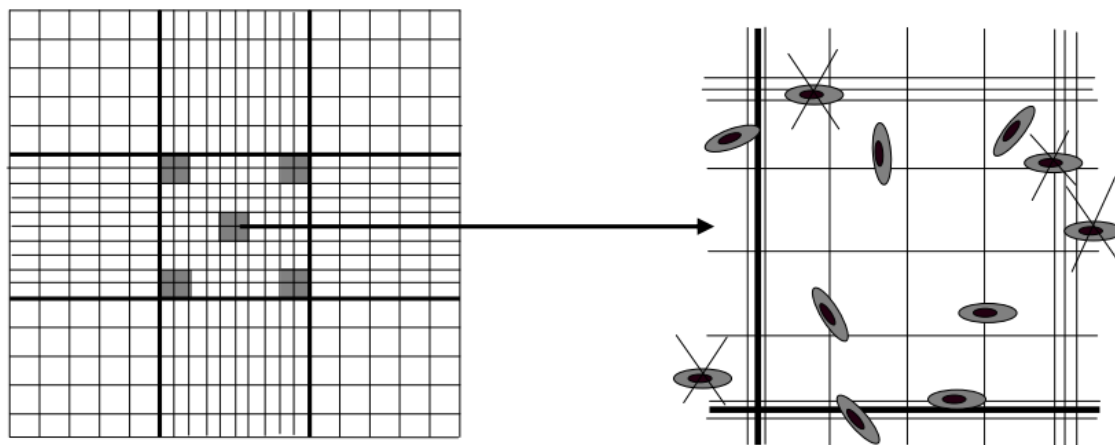


Figura 7 - Câmara de Neubauer "Improved" e regra do "L" na qual as células que tocam nos limites superior e direito não são contadas (Samour & Pendl, 2009b).

A contagem total de leucócitos é realizada em todos os nove quadrados da câmara de contagem, ao invés de apenas no central, aplicando a mesma regra do L e respectivos cuidados. O valor final de leucócitos contados em todos os quadrados é multiplicado por um fator de correção (1,1) e pela diluição (200) para obter a quantidade por microlitro de sangue ou mm^3 (Samour & Pendl, 2009b).

As restantes análises hematológicas são efetuadas a partir dos esfregaços de sangue cuja preparação foi descrita anteriormente. É realizado um varrimento completo dos mesmos para avaliar a distribuição e morfologia das células, sendo excluídos os que apresentam agregações leucocitárias ou plaquetárias, e possível existência de hemoparasitas. Não foi realizada a caracterização da toxicidade celular (Samour & Pendl, 2009b).

A contagem estimada total de leucócitos faz-se com ampliação de 400x (ocular de 10x e objetiva de 40x) e são contados os leucócitos presentes em 10 campos de monocamada, sendo feita a média dos mesmos e esse valor multiplicado por 2000 (Doneley, 2010).

A contagem estimada total de trombócitos é efetuada com uma ampliação de 1000x (objetiva de imersão de 100x) e são contados os trombócitos em 5 campos de monocamada. Este número é dividido pelo número médio de eritrócitos em cinco campos de monocamada com esta ampliação (1000) e multiplicado pelo número médio de eritrócitos por microlitro de sangue em aves saudáveis (3,500,000). Pode ser necessário efetuar correção deste valor em aves com hematócritos inferiores ao intervalo normal (35-55%), sendo esta efetuada multiplicando o valor estimado total de trombócitos pelo HT observado e dividindo o resultado pelo HT normal da espécie (Campbell, 1995).

A contagem estimada diferencial de leucócitos é efetuada também com uma ampliação de 1000x (ocular de 10x e objetiva de imersão de 100x), sendo contadas 100 células que são classificadas morfolologicamente, conforme descrito na revisão bibliográfica, em linfócitos, monócitos, eosinófilos, heterófilos e basófilos. Os valores da contagem individual das células de cada grupo correspondem à percentagem das mesmas dentro dos leucócitos totais. A multiplicação deste valor pelo WBCc e posterior divisão por 100 resulta na quantidade absoluta de leucócitos desse grupo por microlitro de sangue (Samour & Pendl, 2009b).

Por fim, para pesquisa de presença de hemoparasitas é efetuado o varrimento com ampliações progressivamente maiores, culminando em 1000x (ocular de 10X e objetiva de imersão de 100x), dos bordos para o centro e abrangendo todos os campos de monocamada da lâmina. A identificação dos gêneros parasitários foi efetuada de acordo com o descrito em Bennet & Pierce (1988), Peirce *et al.* (1990), Valkiūnas (2005) e Campbell & Ellis (2007).

3.2.3. Análises coprológicas

Para cada amostra foi efetuado um exame direto, sendo este realizado nas amostras individuais de cada dia de colheitas seriadas.

O exame direto foi efetuado colocando uma gota de soro fisiológico numa lâmina e, com auxílio de uma vareta, colocando uma pequena quantidade de amostra que se misturou sobre a lâmina. Colocou-se uma lamela sobre a gota e observou-se ao microscópio numa ampliação de 100x (ocular de 10x e objetiva de 10x) percorrendo toda a lamela. De seguida repetiu-se o varrimento com uma ampliação de 400x (ocular de 10x e objetiva de 40x) para examinar os parasitas (Melvin & Brooke, 1982).

Após os três dias de colheita seriada, foi realizada a homogeneização das amostras, sendo efetuados os restantes exames qualitativos (sedimentação com auxílio de centrífuga, flutuação pela técnica de Willis e coloração Ziehl-Neelsen) e quantitativos (contagem em Câmara de McMaster).

A sedimentação foi efetuada, como mencionado, com o auxílio de centrífuga e de acordo com o protocolo utilizado no laboratório do GREFA (Ver Anexo I). Este protocolo é uma adaptação da sedimentação simples (Barger & MacNeill, 2015), sendo o processo acelerado pelo uso de centrífuga. Homogeneizou-se a amostra com 2 ml de solução de água saturada com sabão e filtrou-se a amostra através de gaze, com o auxílio de um funil, para dentro de um tubo de ensaio. Juntou-se outros 8 ml de solução de água com sabão, homogeneizou-se e centrifugou-se durante um minuto a 2000g. Retirou-se o sobrenadante e voltou-se a suspender a amostra, acrescentando outros 8 ml de solução e centrifugou-se de novo. Este processo foi repetido até o sobrenadante se apresentar transparente. No final,

suspendeu-se o depósito num volume reduzido de solução (inferior a 1 ml) e colocou-se uma gota na lâmina, cobrindo com lamela e observando ao microscópio óptico de forma igual ao descrito para o exame direto.

A flutuação foi efetuada conforme o método de Willis, consistindo este na homogeneização de amostra com 2 ml de solução saturada de cloreto de sódio (sal de cozinha) ou sulfato de magnésio (tendo sido esta última a utilizada neste trabalho). De seguida, filtrou-se a amostra utilizando o mesmo método descrito para a sedimentação e acrescentou-se a mesma solução saturada de diluição até encher todo o tubo de ensaio e formar um menisco. Colocou-se uma lamela sobre o mesmo e após 15 minutos esta foi colocada sobre uma lâmina e observada ao microscópio de forma igual ao já descrito (Barger & MacNeill, 2015).

Foi ainda efetuada a coloração de duas lâminas por amostra com Ziehl-Neelsen, pelo método clássico, como descrito por Tripathi, Desai & Mesquita (2001). Os reagentes utilizados foram a fucsina fenicada, álcool-ácido e azul de metileno. Foi efetuada uma extensão de amostra fecal sobre a lâmina com o auxílio de uma vareta e um pouco de soro fisiológico e esta foi fixada utilizando calor. A lâmina foi de seguida coberta com fucsina fenicada e aquecida levemente durante cinco minutos. Após cinco minutos de arrefecimento, foi lavada com água destilada e coberta com álcool-ácido durante um minuto, após o qual se repetiu a lavagem. Este processo foi repetido até a amostra apresentar uma cor rosada clara. Por último, cobriu-se a lâmina com azul de metileno, deixando-o atuar durante um minuto antes de repetir a lavagem com água. Após secagem da lâmina esta foi observada ao microscópio óptico com uma ampliação de 1000x (ocular de 10X e objetiva de imersão de 100x) utilizando a mesma técnica de varrimento anteriormente descrita para observar toda a extensão da amostra.

Por fim, o método quantitativo de contagem em Câmara de McMaster foi adaptado para acomodar a dificuldade de colheita de grandes quantidades de amostra, assemelhando-se ao método modificado de Wetzel (1951, citado por Vadlejch, Petrtýl, Zaichenko, Cadková, Jankovská, Langrová & Moravec, 2011). Foi utilizado metade do volume total (fezes e solução saturada num volume de 30 ml) de forma a duplicar a probabilidade de observar parasitas em amostras de peso reduzido. Assim, a amostra foi pesada e homogeneizada com solução saturada de sulfato de magnésio de forma a perfazer um total de 30 ml, sendo estes filtrados com gaze e o auxílio de um funil. Utilizando uma pipeta de Pasteur, misturou-se a amostra e colheu-se uma subamostra durante este processo com a qual se encheu ambas as células da Câmara de McMaster, deixando-se de seguida repousar a mesma no microscópio durante cinco minutos. Ambas as câmaras foram então observadas a uma ampliação de 100x

(ocular de 10X e objetiva de 10x), contando-se todas as formas parasitárias encontradas nas duas áreas de contagem. Para calcular o número de ovos presentes por grama de fezes (OPG), há que ter em conta o volume contido na área delimitada de cada câmara, sendo este 0,15 ml (1 cm x 1 cm x 0,15 cm). Ao contar ambas as câmaras, obtém-se um volume examinado de 0,3 ml, um décimo do volume total preparado. Assim, multiplicando por 100 o número de formas parasitárias encontradas obtém-se o total presente na solução diluída preparada, de 30 ml. Para obter o número de OPG basta apenas corrigir este valor tendo em conta o peso da amostra: caso esta fosse 1g (1g + 29ml de solução saturada) basta multiplicar por 100, se apenas tivéssemos 0,5g (0,5 + 29,5ml sol. sat.) seria necessário multiplicar por 200 e caso fossem 2g (2g + 28ml sol. sat.), multiplicaríamos por 50.

As formas parasitárias encontradas foram caracterizadas com base no descrito por Krone (2007), Huffman (2008), Acosta *et al.* (2006), Anderson *et al.* (2009) e Yamaguti (1961), baseando-se a identificação na morfologia e permitindo chegar geralmente apenas até à família ou género.

3.3. Análise estatística

Foi feita uma categorização dos parâmetros hemáticos com base nos valores de referência disponíveis para cada espécie (Anexos III, IV e VII), sendo estes classificados como *aumentados*, *normais* ou *reduzidos*. Como não se encontram descritos os parâmetros hematológicos de todas as espécies englobadas neste estudo, foram feitas substituições por valores da sua ordem ou espécie filogeneticamente mais aproximada com valores disponíveis (Ver Anexo II - árvores filogenéticas geradas utilizando a ferramenta Birdtree).

As substituições executadas foram:

Para *A. gentilis*: Valores diferenciais de leucócitos e rácio H/L de *A. nisus*.

Para *A. fasciata*: Rácio H/L de *A. adalberti*, restantes de *A. chrysaetus*.

Para *P. carbo*: Valores diferenciais de leucócitos de *P. auritus*, todos os restantes valores excepto o hematócrito foram os de *P. atriceps*.

Para *A. otus*: Todos os valores de *A. flammeus*.

Para *M. migrans*: Todos os valores de *M. milvus*.

Para *C. pygargus*: Todos os valores de *C. aeruginosus*.

Para *F. tinnunculus*: Valores absolutos de leucócitos de *F. columbarius*, rácio H/L de Falconiformes.

Para *F. naumanni*: Valores absolutos de leucócitos de *F. columbarius*, rácio H/L de Falconiformes.

Para *B. buteo*: Rácio H/L de *B. jamaicensis*.

Para *G. chloropus*: Rácio H/L de Gruiformes.

Para *B. oedicnemus*: Rácio H/L de Charadriiformes.

Para *S. aluco*: Rácio H/L de Strigiformes, todos os restantes valores de *S. aluco*.

Fez-se a análise estatística descritiva dos dados (Anexo V e VI – dados utilizados para análise) e a avaliação da associação entre variáveis qualitativas. Os dados recolhidos foram analisados utilizando o programa Microsoft Excel 2016 para calcular as frequências relativas e a ferramenta *Epitools* para calcular prevalências e respetivo intervalo de confiança. Foi utilizado o programa R para avaliar a associação entre as variáveis, recorrendo-se ao teste exato de Fisher, de forma a avaliar a presença de associação estatisticamente significativa entre as características dos indivíduos da amostra e a existência ou não de parasitismo, bem como as particularidades do mesmo. Foram consideradas estatisticamente significativas as associações cujo valor $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização da população

Foram analisados os resultados de 34 análises coprológicas e 30 análises hematológicas em 19 espécies diferentes de aves, classificadas em seis grupos funcionais distintos. Das amostras fecais analisadas, 26,47% (9/34) pertenciam às aves de rapina noturnas, grupo funcional mais prevalente, dentro do qual a espécie mais frequente foi *T. alba*, representando 8,8% da população (3/34). Quanto aos restantes grupos funcionais, as aves de rapina diurnas que se alimentam de outras aves constituíam 23,53% (8/34) da amostra, sendo *A. fasciata* a espécie mais frequente, tanto neste grupo como na amostra total, 11,8% (4/34). As aves de rapina diurnas que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres constituíam 20,56% (7/34) da amostra, sendo a espécie mais frequente *Falco tinnunculus*, 8,82% da população (3/34); as aves de rapina diurnas de hábitos necrófagos, 17,65% (6/34); as aves do meio aquático, 8,82% (3/34); e as aves estepárias, 2,94% (1/34).

Relativamente à causa de ingresso, a mais frequente foi traumatismo, constituindo 52,94% (18/34) das causas de morbilidade. Do resto da população, 23,53% (8/34) provinham de cativo, 14,71% (5/34) ingressaram devido a debilidade, 5,88% (2/34) eram crias e 2,94% (1/34) eram vítimas de intoxicação. Pode-se ainda notar que 76,47% (26/34) dos animais se encontravam em estado selvagem antes de entrarem no centro de recuperação.

Quanto às rapinas noturnas, 100% (9/9) dos indivíduos analisados encontravam-se em estado selvagem. Já dentro das rapinas diurnas que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres, 86% (6/7) dos indivíduos encontravam-se em estado selvagem, sendo que os restantes 14% (1/7) provinham de cativo. Quanto às rapinas diurnas de hábitos necrófagos, 50% (3/6) eram selvagens e 50% (3/6) de cativo. Similarmente, nas rapinas diurnas que se alimentam de outras aves, 50% (4/8) dos indivíduos encontravam-se em estado selvagem e os restantes provinham de cativo. Todos os indivíduos pertencentes às aves de hábitos aquáticos (3/3) e estepárias (1/1) se encontravam em estado selvagem.

Atentando à sobreposição dos grupos funcionais com a causa de ingresso, verifica-se que 66,67% (6/9) dos indivíduos pertencentes às rapinas noturnas ingressaram devido a traumatismo, 22,22% (2/9) eram crias e 11,11% (1/9) ingressaram devido a debilidade. É de salientar que a totalidade dos ingressos de crias pertencem a este grupo funcional. No caso das aves de rapina diurnas que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres, tanto o traumatismo como a debilidade representavam 42,86% (3/7) e o cativo 14,29% (1/7) dos ingressos. Nas aves de rapina diurna de hábitos necrófagos, 50% (3/6) dos ingressos foram animais de cativo, 33,33% (2/6) foram devido a traumatismo e 16,67% (1/6) devido a debilidade. Nas aves de rapina diurnas que se alimentam de outras aves, também 50% (4/8)

foram animais provindos de cativeiro. Para além destes, 37,5% (3/8) ingressaram devido a traumatismo e 12,5% (1/8) devido a intoxicação. É de salientar que a totalidade dos ingressos por intoxicação pertence a este grupo funcional. Por último, tanto as aves de hábitos aquáticos (3/3) quanto as estepárias (1/1) devem 100% dos seus ingressos a traumatismo.

A percentagem elevada de animais ingressados de cativeiro, bem como a proporção destes dentro dos grupos funcionais das aves de hábitos necrófagos e que se alimentam de outras aves deve-se à transferência de animais provindos de outros centros de recuperação de fauna selvagem. Ingressaram nesta situação três *A. monachus* provindos do CREA Los Villares (Córdoba), duas *A. fasciata* da Riserva Regionale Lago di Vico (Caprarola, Itália) e outras duas *A. fasciata* do Centro LPO-UFCS (Saint Denis-Du-Payré, Vendée). Ambas as espécies se encontram ameaçadas e são alvo de programas de reprodução e reintrodução, sendo essa a razão do seu ingresso. Apenas um indivíduo pertencente a esta causa de ingresso se encontrava em cativeiro ilegal (*F. naumanni*).

A totalidade dos ingressos de crias pertencem ao grupo funcional aves de rapina noturnas, o que se pode dever ao facto de a recolha de amostras ter sido feita num período que incluiu a época de reprodução destas aves (Snow, Perrins & Gilmour, 1998; Madroño *et al.*, 2004). Durante esse período ingressaram crias de outros grupos funcionais, no entanto foram consideradas demasiado frágeis para serem incluídas no estudo.

A causa de ingresso mais comum em todos os grupos funcionais, excluindo estas duas exceções, foi traumatismo. Juntamente com as crias órfãs é, consistentemente, uma das causas de ingresso de espécies selvagens em CRAS mais comuns (apesar da sazonalidade dos ingressos de crias). Num estudo retrospectivo (1995 a 2007) efetuado por Molina-López, Casal & Darwich (2011) num CRAS na Catalunha, foram analisadas as causas de morbilidade de 7021 aves de rapina (3521 Strigiformes e 3500 Falconiformes pertencentes a, respetivamente, 7 e 23 espécies). As principais causas de morbilidade foram o traumatismo (49,5%), principalmente em Falconiformes, e a admissão de crias órfãs (32,2%), principalmente em Strigiformes, o que vai ao encontro dos resultados encontrados no presente trabalho.

4.2. Prevalências

Das 34 amostras fecais analisadas 20 foram positivas, o que representa uma prevalência de infeção de 58,82%, IC 95% [42,22%; 73,63%]. Destas, três (Tabela 7) encontravam-se parasitadas por mais de uma espécie de parasita gastrointestinal (8,82% da população total, IC 95% [3,05%; 22,96%]) (exemplo na Figura 8).

Tabela 7. Casos de parasitose múltipla gastrointestinal.

Espécie	Causa de Ingresso	Agente GI 1	OPG 1	Agente GI 2	OPG 2
<i>P. carbo</i>	Traumatismo	Oocistos de coccídea	3666	<i>Capillaria</i> sp.	1000
<i>B. oedienemus</i>	Traumatismo	Céstode	7300	<i>Capillaria</i> sp.	9500
<i>A. otus</i>	Traumatismo	Céstode	<200	<i>Synhimantus</i> sp.	n.a.

Legenda. Agente GI 1 – Primeiro parasita gastrointestinal; OPG 1 – ovos por grama de fezes, do primeiro parasita; Agente GI 2 – Segundo parasita gastrointestinal; OPG 2 – ovos por grama de fezes, do segundo parasita.

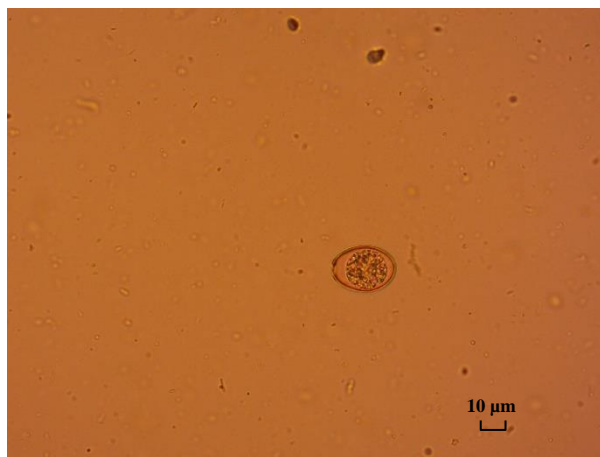


Figura 8 – Oocisto de coccídea em *P. carbo* (flutuação, ampliação de 400x).

Quanto aos parasitas encontrados, o mais frequente foi sem dúvida *Capillaria* sp., representando 65,22% (15/23), IC 95% [44,89%; 81,19%], dos parasitas gastrointestinais encontrados. Tanto *Sarcocystis* sp. como os céstodes representavam 13,04% (3/23), IC 95% [4,54%; 32,13%], por último, tanto *Synhimantus* sp. como oocistos de coccídea não esporulados perfaziam 4,35% (1/23), IC 95% [0,77%; 20,99%] (figuras 9 a 12).

Num artigo de Berto, Cardozo, Gomes, Fonseca & Lopes (2014), foi descrita infecção por *Sarcocystis* sp. em 28,5% dos exemplares analisados de Coruja-das-torres (*T. alba*).

Apesar de ter sido efetuada uma pesquisa em esfregaços fecais corados pela técnica de Ziehl-Neelsen de todos os indivíduos, não foi observada infecção por *Cryptosporidium* sp. em nenhum animal.

Num estudo efetuado por Ferrer, Molina, Adelantado & Kinsea (2004) na Catalunha, foram analisados tratos digestivos de 119 rapinas diurnas de 13 espécies diferentes (seis em comum com o presente estudo). A prevalência de infecção foi 79,8%, sendo que se identificaram nemátodes em 75,6% dos indivíduos, tremátodes em 27,7%, céstodes em 17,6% e acantocéfalos em 6,7%. A análise foi efetuada post-mortem por meio de necrópsia, o que poderá explicar a maior prevalência de infecção em relação à encontrada no presente estudo. Quanto aos parasitas encontrados em comum, os capilarídeos intestinais estavam presentes em 29,4% dos animais infetados e *Synhimantus* sp. em 31,1% dos casos (quase exclusivamente em *Accipiter* spp., *B. buteo* e *F. tinnunculus*). As diferenças em relação aos resultados obtidos poderão dever-se às diferenças temporais e espaciais entre os estudos, bem

como às espécies incluídas na amostra que inclui, no caso presente, espécies para além dos Falconiformes e Strigiformes.



Figura 9 – *Sarcocystis* sp. (esporocistos indicados por setas) em *A. otus* (sedimentação, ampliação de 400x).



Figura 10 – Ovo de *Capillaria* sp. em *B. buteo* (flutuação, ampliação de 400x).

Um outro artigo, de Sanmartín, Álvarez, Barreiro & Leiro (2004), detetou *Synhimantus* sp. em todos os Strigiformes analisados, excepto *A. noctua*, não sendo o primeiro a obter estes resultados (Kutzer *et al.*, 1980; Krone, 2000). Em Espanha e Portugal este género foi encontrado em vários trabalhos, nas espécies *A. nisus*, *B. buteo*, *B. bubo*, *A. otus*, *T. alba*, *E. caeruleus*, *F. peregrinus* e *F. tinnunculus* (Illescaz-Gómez *et al.*, 1993; Cordero del Campillo *et al.*, 1994; Magalhães *et al.*, 1998; Tomás, 2014; Antunes, 2016; Carrega, 2016).

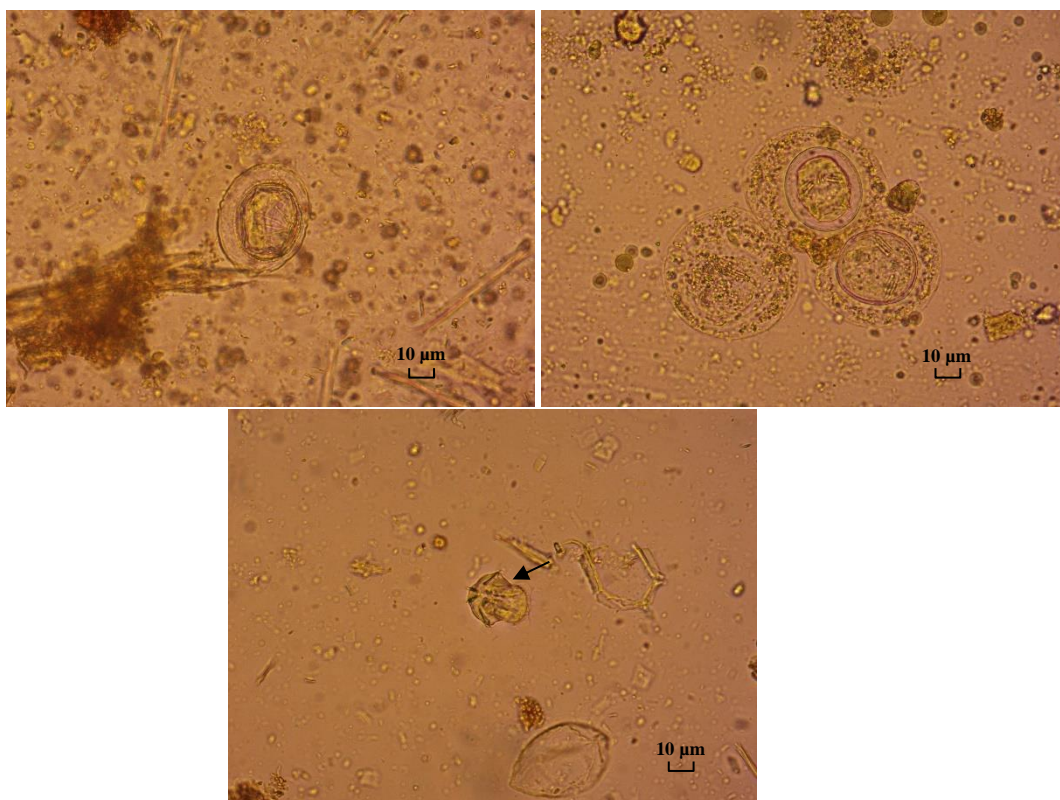


Figura 11 – Em cima, ovos de Cestoda (esquerda: exame direto, ampliação de 400x; direita: sedimentação ampliação de 400x); em baixo, oncosfera de Cestoda indicada por seta (exame direto, ampliação de 400x) em *B. oedicornis*.



Figura 12 – *Synhimantus* sp. em *A. otus* (exame direto, ampliação de 100x)

Dos 30 esfregaços sanguíneos analisados, sete foram positivos, correspondendo a uma prevalência de infecção de 23,3%, IC 95% [11,79%; 40,93%].

Das espécies de hemossporídeo encontradas, a mais frequente foi *Leucocytozoon* sp. constituindo 71,43% (5/7), IC 95% [35,89%; 91,78%], dos resultados positivos (ou 17% dos esfregaços analisados), enquanto *Plasmodium* sp. representava 28,57% (2/7), IC 95% [8,22%; 64,11%] (ou 6,7% do total).



Figura 13 – *Leucocytozoon* sp. em *A. otus* indicado por seta (Câmara de Neubauer, ampliação de 400x).

Num estudo efetuado por Krone *et al.* (2008), foram analisadas amostras de sangue de 101 aves de rapina de 14 espécies diferentes por dois métodos (análise morfológica e PCR). Os resultados da análise morfológica, método idêntico ao utilizado no presente estudo, indicam uma prevalência de infeção por hemosporídeos de 19,8%. Destes, a mais comum foi o *Leucocytozoon* spp. (10,9%), seguida de *Plasmodium* spp. (5,9%) e *Haemoproteus* spp. (4,9%). Tanto a prevalência de infeção como a prevalência das espécies de hemosporídeo encontradas no presente estudo foram superiores, o que pode dever-se ao acaso ou às diferenças nas áreas geográficas e nas espécies amostradas. São semelhantes, no entanto, na medida em que se manteve a ordem da frequência relativa de hemosporídeos.

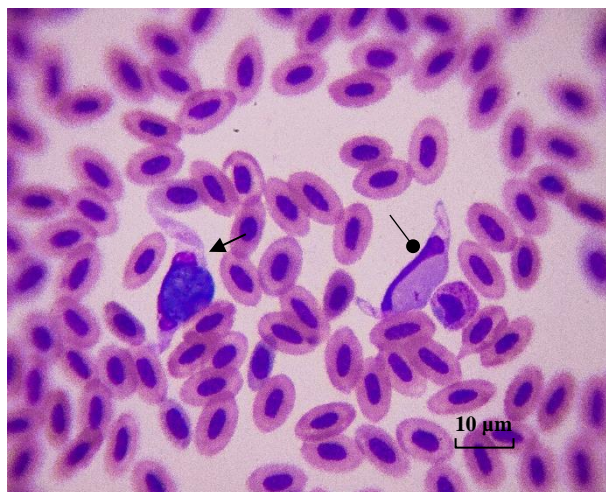


Figura 14 – Macrogametócito (seta) e microgametócito (círculo) de *Leucocytozoon* sp. em *S. aluco* (esfregaço, ampliação de 1000x).

Num outro estudo, realizado por Hellgren, Pérez-Tris & Bensch (2009), foram analisados 3981 indivíduos e a prevalência de infeção geral foi de 39,4%, tendo sido observado que esta varia muito conforme a espécie de hospedeiro. Foram observadas também infeções por mais de um género de hemosporídeo em 80 indivíduos, algo que não é particularmente comum. No presente estudo não foi observado nenhum caso de

poliparasitismo hemático. Para além da influência da sazonalidade dos ciclos de vida e baixas temperaturas no período de amostragem, que poderão ter condicionado o contacto com os vectores, está comprovado que a susceptibilidade ao estabelecimento de infeção por hemosporídeos é aumentada pela presença de endoparasitas, mas não pela presença de outros hemosporídeos pelo que a infeção por uma espécie de hemosporídeo não implica a existência de poliparasitismo por hemoprotozoários. Por este motivo e por não ser uma ocorrência comum, não é estranho que não tenha sido encontrada infeção por mais de um género de hemosporídeo (Bordes & Morand, 2011).

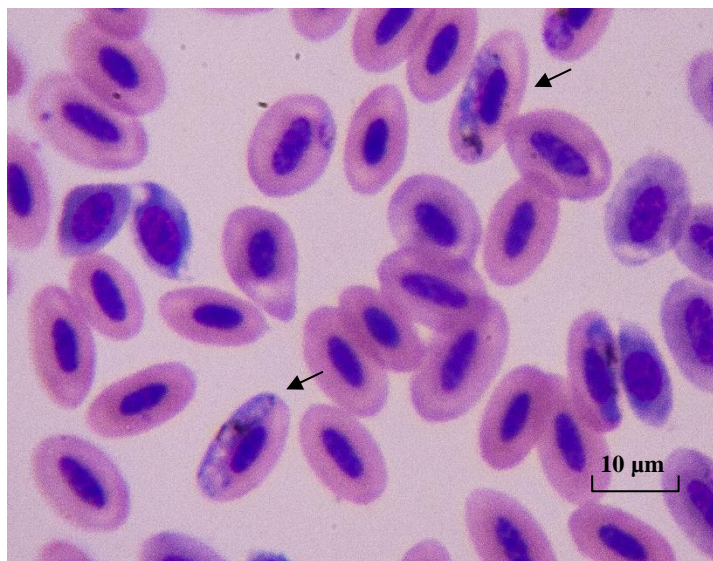


Figura 15 – *Plasmodium* sp. em *F. tinnunculus*, indicado por setas (esfregaço, ampliação de 1000x)

Em Portugal encontram-se descritas infeções por *Leucocytozoon* sp. e *Haemoproteus* sp. em *A. gentilis*, *B. buteo*, *F. tinnunculus*, *A. flammeus*, *B. bubo*, *S. aluco* e *T. alba*, sendo a prevalência reportada mais elevada em Strigiformes que em Falconiformes, e sendo *Leucocytozoon* sp. o hemoprotozoário mais comum (Santos, Pereira, Melo & de Carvalho, 2008; Zacarias, 2017). Em Espanha, um trabalho de Viana (2010), descreveu infeção por *Leucocytozoon* sp. em *B. buteo*, *Bubo bubo*, *A. noctua*, *S. aluco* e *A. otus*, por *Haemoproteus* sp. em *F. tinnunculus*, *F. naumanni*, *B. bubo* e *S. aluco*, por *Plasmodium* em *B. buteo*, *F. naumanni* e *B. bubo*, e por *Trypanosoma* em *S. aluco*. A prevalência de infeção foi de 35,6 %, sendo superior à do trabalho presente.

A localização dos parasitas foi classificada conforme estes foram encontrados no trato gastrointestinal, no sangue, em ambos ou nenhum. Dos animais parasitados 43,33% (13/30) tinham localização gastrointestinal, 20% (6/30) tinham parasitas em ambas as localizações e 3,33% (1/30) tinham apenas hemoparasitas.

O caso mais frequente foi a infeção exclusivamente gastrointestinal, o que era esperado devido aos hábitos das espécies analisadas, tanto alimentares como sociais e de

habitat. Grande parte da alimentação das aves de rapina consiste em potenciais hospedeiros intermediários e paraténicos de helmintes (pequenos mamíferos terrestres, invertebrados e mesmo outras aves). No caso das aves com hábitos necrófagos, o risco aumenta devido à decomposição do alimento e aos hábitos comunitários de alimentação. Em termos de habitat, a proximidade de corpos de água, terrenos agrícolas e mesmo a alimentação dentro de água (caso dos indivíduos pertencentes ao grupo funcional aves de hábitos aquáticos) potenciam a exposição a vetores e hospedeiros intermediários, tanto de helmintes, como de hemossporídeos (Snow, Perrins & Gilmour, 1998).

É curioso que seja mais comum a infeção mista do que a infeção exclusivamente hemática. Possibilidades a considerar serão a variação sazonal da exposição a vetores, ou a atuação de um dos agentes como fator protetor ou imunossupressor, facilitando a infeção posterior por outro parasita. Existem vários estudos que fundamentam esta possibilidade, nomeadamente acerca do impacto do poliparasitismo na resposta imune e até mesmo na adaptação evolutiva desta, em espécies de aves e mamíferos (Bordes & Morand, 2011).

A co-infeção por helmintes e microparasitas encontram-se particularmente bem estudadas (em humanos, modelos murinos e aves). Alguns destes estudos relatam que a infeção por helmintes pode induzir o desenvolvimento de células Th-2 após a infeção. Estas células têm efeitos vastos e variados, a nível sistémico, nas mucosas, medula óssea e tecidos. Conforme o tipo de parasita presente, a eficiência da resposta imune por meio de citocinas e respetivas consequências, é diferente (Gause, Urban & Staderker, 2003). Quando existe infeção múltipla, ocorre inibição simultânea de diferentes componentes da resposta imune pelos helmintes (inibem a interleucina-4) e microparasitas (inibem interferão-gama), o que leva ao aumento da parasitemia e ao agravamento da condição corporal e do índice de mortalidade. Este fenómeno foi observado em infeções mistas de helmintes e *Plasmodium* spp. (Bentwich *et al.*, 1999; Cox, 2001; Druilhe, Tall & Sokhna, 2005).

Nos casos em que a infeção múltipla se deve a duas espécies de helmintes (caso referido neste trabalho como parasitose múltipla gastrointestinal) a maioria dos estudos demonstra um aumento da taxa de infeção, no entanto pode-se dar o caso de uma das espécies prevenir o estabelecimento de infeção pela segunda. Este último caso consiste normalmente no despoletar por parte dos adultos de uma reação imune à qual conseguem evadir-se, mas à qual as larvas não sobrevivem (Cox, 2001).

Em aves, foi demonstrada uma suscetibilidade aumentada a outros parasitas em resposta ao poliparasitismo (Telfer *et al.*, 2010), bem como aumento da taxa metabólica basal (Martin, Scheuerlein & Wikelski, 2003), deterioração da condição física (Holmstad, Hudson & Skorpning, 2005), diminuição da sobrevivência e fecundidade (Holmstad, Hudson &

Skorping, 2005; Davidar & Morton, 2006; Del Cerro *et al.*, 2010), e até mesmo alterações fenotípicas, como a cor da plumagem de *Parus caeruleus* infetados por protozoários sanguíneos múltiplos (Del Cerro *et al.*, 2010) e a cor do bico dos machos de *Turdus merula* poliparasitados por combinações de endo-, ecto- e hemoparasitas (Biard, Saulnier, Gaillard & Moreau, 2010) devido a alteração do metabolismo de carotenóides plasmáticos.

No presente estudo, as espécies que apresentaram contagens mais elevadas de OPG foram *B. oedienemus* e *P. carbo*. Os indivíduos que apresentaram contagens de hemoparasitas (parasitemia) por litro de sangue mais elevadas foram *F. tinnunculus* para *Plasmodium* sp. (um indivíduo) e um *A. otus* para *Leucocytozoon* sp. (um indivíduo) (Tabela 2). As contagens elevadas neste caso podem dever-se a maior suscetibilidade da espécie, no entanto não é sensato chegar a essa conclusão sem análise prévia dos casos concretos individuais, quer por análise da Tabela 8, quer por avaliação discriminada dos mesmos.

Tabela 8. Resultados da análise coprológica quantitativa.

Espécie	ID	Agente GI 1	OPG 1	Agente GI 2	OPG 2	Agente H	Qtd./l
<i>A. flammeus</i>	15/0097	<i>Capillaria</i> sp.	760	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>A. gentilis</i>	15/0424	<i>Capillaria</i> sp.	2000	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>A. nisus</i>	15/0045	<i>Capillaria</i> sp.	n.a.	Negativo	n.a.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	1x10 ⁹
<i>A. otus</i>	15/0139	<i>Sarcocystis</i> sp.	800	Negativo	n.a.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	5,06x10 ⁹
<i>A. otus</i>	15/0352	Cestoda	<200	<i>Synhimantus</i> sp.	n.a.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	2,2x10 ⁹
<i>B. bubo</i>	15/0384	Cestoda	<100	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.
<i>B. buteo</i>	15/0076	<i>Capillaria</i> sp.	2400	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>B. buteo</i>	15/0193	<i>Capillaria</i> sp.	100	Negativo	n.a.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	2,8x10 ⁹
<i>B. oedienemus</i>	15/0231	Cestoda	7300	<i>Capillaria</i> sp.	9500	Negativo	n.a.
<i>C. aeruginosus</i>	15/0353	<i>Capillaria</i> sp.	<200	Negativo	n.a.	<i>Plasmodium</i> sp.	0,01x10 ¹²
<i>F. tinnunculus</i>	15/0170	<i>Sarcocystis</i> sp.	<200	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>F. tinnunculus</i>	15/0374	<i>Capillaria</i> sp.	4000	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>F. tinnunculus</i>	15/0390	Negativo	<100	Negativo	n.a.	<i>Plasmodium</i> sp.	0,59x10 ¹²
<i>G. chloropus</i>	15/0140	<i>Capillaria</i> sp.	<200	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>M. migrans</i>	15/0506	<i>Capillaria</i> sp.	<100	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>P. carbo</i>	15/0057	<i>Capillaria</i> sp.	13600	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.
<i>P. carbo</i>	15/0106	Oocistos de Coccídeo	3666	<i>Capillaria</i> sp.	1000	n.a.	n.a.
<i>S. aluco</i>	15/0264	<i>Capillaria</i> sp.	2600	Negativo	n.a.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	0,8x10 ⁹

Legenda. ID – número de historial do indivíduo; Agente GI 1 – Primeiro parasita gastrointestinal; OPG 1 – ovos por grama de fezes, do primeiro parasita; Agente GI 2 – Segundo parasita gastrointestinal; OPG 2 – ovos por grama de fezes, do segundo parasita; Agente H – Hemoparasita; Qtd/l – parasitemia.

B. oedienemus 15/0231 deu entrada no centro por traumatismo, no entanto encontrava-se já emaciado e desidratado, podendo-se categorizar como débil. Esta debilidade causou certamente algum nível de imunodepressão como comprovado para outras espécies (Dohms & Metz, 1991; Maxwell, 1993). A amostra foi colhida após dois dias no internamento com manipulação diária e esta espécie é muito suscetível ao stress e pouco habituada ao contato

humano como reportado noutros trabalhos (Tella, Torre & Sanchez, 1996; Green, Tyler & Bowden, 2000). Pode-se atribuir o poliparasitismo e valor elevado das contagens a uma combinação destes fatores, sendo improvável que a espécie tenha sido determinante.

A ave da espécie *P. carbo* 15/0057 foi capturada numa ETAR, apresentando uma ferida recente. No entanto, encontrava-se muito magro o que juntamente com o local onde foi encontrado indica alguma redução do movimento, condição física e, possivelmente, da capacidade de resposta imunitária (Keller & Visser, 1999). Para além disto, a amostra de sangue foi colhida após três dias no internamento pelo que os resultados poderão ter sido influenciados por uma combinação do estado físico e do stress como demonstrado noutras investigações (Dohms & Metz, 1991; Maxwell, 1993).

O indivíduo da espécie *P. carbo* 15/0106 encontrava-se magro e apresentava uma fratura exposta. Apesar de ter sido classificado como traumatismo, a coloração escura do osso indica que a lesão tinha já algum tempo tratando-se, portanto, de outro processo arrastado que poderá ter impactado a sua resposta imunitária como demonstrado noutros trabalhos (Dohms & Metz, 1991).

No caso do espécime de *A. otus* 15/0139, o animal ingressou vítima de atropelamento tendo decorrido um dia entre a sua recolha e entrega no centro. Apesar de a colheita de fezes ter sido efetuada após dois dias, a de sangue só foi efetuada após uma semana, devido ao estado debilitado do paciente. É provável que a parasitémia elevada deste animal se deva ao stress e potencial imunodepressão (devido ao quadro clínico e à semana de internamento com manipulação diária), como referido também por Maxwell (1993).

No caso da ave *A. otus* 15/0352, apesar da causa de ingresso ser traumatismo, o animal apresentava-se muito débil, magro e desidratado. Passou também neste caso um dia entre a recolha e a entrega no centro, e a amostra de sangue foi colhida após duas semanas. É igualmente possível atribuir o poliparasitismo e a parasitémia elevada deste exemplar a imunossupressão causada pela debilidade e a stress das semanas de internamento, tal como reportado por outros autores (Dohms & Metz, 1991; Maxwell, 1993).

Por último, também o representante de *F. tinnunculus*, 15/0390, se encontrava magro ao ingresso, incapaz de recolher a asa esquerda ou voar e com úlceras na córnea. Tudo isto indica um possível traumatismo antigo, sendo um processo arrastado ao qual se pode atribuir a parasitémia elevada. É de salientar que nenhum outro exemplar desta espécie apresentava parasitémias elevadas.

Após análise dos casos individuais, parece muito mais provável que as contagens elevadas de formas parasitárias, tanto no sangue como nas fezes, se devam ao estado

debilitado e imunodepressão a que cada exemplar estava sujeito, e não a suscetibilidade da espécie a que pertencem.

Atentando agora à sobreposição entre os grupos funcionais e a localização dos parasitas verifica-se que, nas rapinas noturnas, 33,33% (3/9) dos animais analisados apresentavam parasitas em ambas as localizações e 22% (2/9) exclusivamente no trato gastrointestinal. Em relação às aves de rapina diurnas que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres, 57,14% (4/7) apresentavam parasitas com localização gastrointestinal e tanto os que apresentavam em ambas as localizações, como os que os apresentavam apenas no sangue correspondiam a 14,29% (1/7), sendo de salientar que a totalidade dos animais com localização parasitária exclusivamente sanguínea se encontra neste grupo funcional. Já nas aves de rapina diurnas necrófagas o único animal parasitado, ou seja, 16,67% (1/6) dos animais analisados, apresentava parasitas gastrointestinais. Dentro das aves de rapina diurnas que se alimentam de outras aves, 25% (2/8) dos animais analisados apresentavam parasitas com localização gastrointestinal e outros 25% (2/8) apresentavam parasitas tanto gastrointestinais como no sangue. Quanto às aves de hábitos aquáticos a totalidade da amostra, ou seja, 100% (3/3) apresentava parasitas gastrointestinais. A mesma situação verifica-se no caso das estepárias em que a única ave pertencente a este grupo funcional apresentava parasitas gastrointestinais.

Como já foi mencionado, é expectável que os animais que se alimentam de pequenos mamíferos, como é o caso das aves de rapina noturnas e das que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres, apresentem mais parasitas com localização gastrointestinal.

Os casos em que se identificaram parasitas em ambas as localizações podem-se dever à modulação da resposta imune pelos helmintes referida anteriormente (Bentwich *et al.*, 1999; Cox, 2001; Gause, Urban & Stadercker, 2003).

No caso das necrófagas os resultados não são indicativos uma vez que todos os indivíduos deste grupo, à exceção de um, provêm de cativeiro (tendo-lhes sido dado alimento de qualidade superior e possivelmente desparasitantes). O mesmo se aplica aos indivíduos não parasitados que se alimentam de outras aves, porém é interessante neste grupo a proporção reduzida de parasitose exclusivamente gastrointestinal em comparação com os que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres, em concordância com a influência proposta dos hábitos alimentares. Os resultados das aves de hábitos aquáticos poderão dever-se ao habitat e à sua alimentação, que inclui plantas, peixes e invertebrados aquáticos, ambos possíveis hospedeiros intermediários de helmintes.

4.3. Análise exploratória dos dados

Não se encontrou associação da causa de ingresso ao grupo funcional ($p > 0,05$), no entanto esta foi encontrada em relação à espécie, verificando-se que a totalidade dos ingressos de *A. flammeus*, *A. gentilis*, *A. nisus*, *A. otus*, *B. oedicnemus*, *F. columbarius*, *G. chloropus*, *G. fulvus*, *P. carbo* e *S. aluco* se deveu a traumatismo. Já *A. fasciata*, *A. monachus* e *F. naumanni* devem a totalidade dos seus ingressos a cativeiro, *B. bubo* a crias caídas do ninho e *C. aeruginosus* a intoxicação. Tanto *B. buteo* como *M. migrans* têm os ingressos distribuídos igualmente, com 50% dos indivíduos ingressados devido a debilidade e os restantes devido a traumatismo. *F. tinnunculus* tem 67% de ingressos por debilidade e 33% por traumatismo e, por último, em *T. alba*, 33% dos seus ingressos são por debilidade e os restantes 67%, por traumatismo ($p < 0,001$). É possível que a associação significativa neste caso se deva ao reduzido número de indivíduos da amostra, juntamente com o elevado número de classes utilizado (19 espécies e 5 causas de ingresso). Como mencionado anteriormente, traumatismo é a principal causa de morbilidade em aves selvagens. Outros fatores a ter em conta são os, previamente mencionados, elevado número de indivíduos de espécies ameaçadas provenientes de cativeiro legal (*A. monachus* e *A. fasciata*) e especificidade das crias (todas de *B. bubo*).

Foi encontrada associação da causa de ingresso com a existência de parasitismo, verificando-se que nem os animais ingressados de cativeiro se encontravam parasitados, nem as crias (uma das crias apresentava um ovo de céstode no exame direto do primeiro dia da colheita seriada de amostra fecais, mas as restantes análises coprológicas foram todas negativas e a contagem de OPG encontrava-se abaixo do limite de deteção, considerando-se um efeito de *low parasite burden*, pseudoparasitismo ou possível erro da técnica). Já os ingressados por *intoxicação* encontravam-se todos parasitados. Dos animais ingressados por *debilidade*, 80% encontravam-se parasitados e os devido a traumatismo, 83% ($p < 0,001$). A associação no caso dos animais de cativeiro já foi explicada pela sua alimentação e possível desparasitação. No caso das crias, estando estas saudáveis, é expectável que não se encontrem muito, ou de todo, parasitadas. A vítima de intoxicação encontrava-se debilitada e suscetível à infeção. Aqui, é interessante verificar a percentagem elevada de parasitose nos animais ingressados por traumatismo face aos debilitados. No entanto, isto é facilmente explicado pelo fato de muitos dos animais politraumatizados, apesar de se encontrarem assumidamente saudáveis até ao momento do traumatismo, não serem recolhidos até vários dias após o mesmo (por não serem encontrados ou não permitirem a recolha até se encontrarem mais fracos). Assim, no momento do ingresso devido a traumatismo encontram-se já debilitados e suscetíveis a infeção, alterando a interpretação dos resultados.

Foi ainda encontrada associação da causa de ingresso à localização dos parasitas, sendo que 61% dos animais ingressados por traumatismo apresentavam parasitas com localização gastrointestinal e 22% em ambas as localizações (gastrointestinal e hemática); 40% dos ingressados por debilidade tinham localização gastrointestinal, 20% hemática e 20% ambas; e por último 100% dos ingressados por intoxicação apresentavam parasitas em ambas as localizações ($p < 0,001$). É provável que esta associação se deva, mais uma vez, aos hábitos alimentares e estado hígido dos animais, sendo relevante mencionar que dentro dos ingressos por traumatismo, os grupos funcionais mais prevalentes foram aves de rapina noturnas (que se alimentam principalmente de pequenos mamíferos), aves de hábitos aquáticos (que se alimentam de peixe, plantas e invertebrados aquáticos) e aves de rapina diurnas que se alimentam de pequenos mamíferos terrestres, sendo estes os grupos mais facilmente expostos a formas parasitárias infetantes. Como foi mencionado anteriormente, a infeção por parasitas gastrointestinais pode facilitar e exacerbar a infeção por hemosporídeos sendo natural que se encontrem, em muitos casos, parasitas em ambas as localizações (Bentwich *et al.*, 1999; Cox, 2001; Gause, Urban & Stadecker, 2003; Druilhe, Tall & Sokhna, 2005).

É interessante também notar que dentro dos ingressos por debilidade a percentagem relativa de parasitoses mistas é superior à das outras causas. É também o único grupo no qual se encontra parasitose exclusivamente hemática, podendo os processos arrastados e debilidade associada facilitar o estabelecimento de infeção por hemosporídeos (Doneley, 2016). No entanto, uma vez que apenas se observou um caso de hemoparasitose exclusiva, estes resultados podem não corresponder à realidade.

Finalmente, existe associação à espécie dos parasitas gastrointestinais, verificando-se que 60% dos animais ingressados por debilidade, 100% dos ingressados por intoxicação e 50% dos ingressados por traumatismo apresentavam *Capillaria* sp.; 11,1% dos animais ingressados por traumatismo e 50% das crias apresentavam ovos de Cestoda (apesar de se ter considerado *low parasite burden*); e, finalmente, 5,6% dos ingressos por traumatismo apresentavam oocistos de coccídeo e 16,7% esporocistos de *Sarcocystis* sp. ($p < 0,01$).

A associação da causa de ingresso à parasitose múltipla gastrointestinal ($p > 0,05$) e ao agente hemático ($p > 0,05$), não são estatisticamente significativas.

Quanto ao estado (selvagem ou em cativeiro) do indivíduo, procurou-se associação com a existência de parasitismo. Verificou-se que nenhum dos animais de cativeiro se encontrava parasitado e que 76,9% dos em estado selvagem apresentavam parasitas ($p < 0,001$). É evidente, no caso dos animais em cativeiro, que esta se deve às condições em que são mantidos, como o habitat controlado e higienizado, o alimento de qualidade controlada e as potenciais desparasitações. A prevalência de infeção dos animais em estado selvagem é

aproximada à encontrada noutros estudos efetuados em regiões próximas com espécies semelhantes (Krone, 2000; Borgsteede *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2010), nomeadamente na Catalunha, onde a prevalência de infeção foi 79,8% (Ferrer, Molina, Adeantado & Kinsea, 2004). É, no entanto, bastante superior à prevalência de 21,9% encontrada por Carrega (2013) e à de 52,9% relatada por Antunes (2016), que pesquisaram apenas parasitas nas fezes e nas fezes e por necrópsia, respetivamente. É também superior à de 35,6% relatada por Viana (2006) que pesquisou apenas hemoparasitas. Estas diferenças podem dever-se a vários fatores, como a diferença nos parasitas pesquisados (a maior abrangência do estudo presente relativamente aos mencionados) e técnicas utilizadas, variação nas espécies amostradas e dimensão da amostra, bem como possíveis variações geográficas entre os locais de estudo (Krone, 2000). Quanto à localização, em relação aos animais em estado selvagem, 50% apresentavam parasitas gastrointestinais, 3,8% hemáticos e 23,1% apresentavam parasitas em ambas as localizações. A totalidade dos animais de cativeiro não apresentava parasitas em nenhuma localização ($p < 0,001$). Observa-se uma maior incidência de parasitismo gastrointestinal em relação às outras localizações e é mais comum a infeção mista que a exclusivamente hemática (as possíveis razões foram já discutidas anteriormente). A associação é evidente devido ao fato de nenhum animal de cativeiro se encontrar parasitado. Quanto à espécie dos parasitas gastrointestinais e ainda apenas em relação aos animais em estado selvagem, 50% apresentavam *Capillaria* sp., 11,5% céstodes, 3,8% apresentavam oocistos de coccídeos e 11,5% esporocistos de *Sarcocystis* sp. ($p < 0,01$). Mais uma vez a associação deve-se à ausência de parasitismo nos animais de cativeiro do presente estudo. O parasita mais prevalente é *Capillaria* spp., em concordância com os outros estudos previamente mencionados (Sanmartín *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2004; Antunes, 2016). Não existe associação estatisticamente significativa com a parasitose múltipla gastrointestinal ($p > 0,05$) e o agente hemático ($p > 0,05$), o que é expectável uma que vez, mesmo dentro dos animais em estado selvagem, a frequência do poliparasitismo gastrointestinal é muito baixa, sendo provavelmente mais influenciada pela condição física do que pelo estado, selvagem ou de cativeiro. O mesmo pode aplicar-se ao agente hemático.

Quanto ao grupo funcional verificou-se que apenas as aves de rapina noturnas, de hábitos aquáticos e estepárias apresentavam parasitismo múltiplo (respetivamente 11,1%, 33,3% e 100%), existindo associação entre estes fatores ($p = 0,04$). Além da frequência reduzida do poliparasitismo, que pode levar a associação estatística só por si, todos os animais que o apresentavam encontravam-se em estado debilitado (tendo sido discutidos os casos concretos anteriormente) sendo mais provável que estes resultados estejam relacionados com o estado de saúde dos indivíduos do que com o grupo funcional. Não se encontrou associação

estatisticamente significativa à existência de parasitismo ($p > 0,05$), localização de parasitas ($p > 0,05$), agente parasitário gastrointestinal ($p > 0,05$) ou hemático ($p > 0,05$), o que faz sentido, pois os fatores que influenciam a parasitose estão relacionados com condições que afetam a capacidade imunitária dos indivíduos e não necessariamente com o seu grupo funcional (apesar deste poder influenciar a exposição a parasitas e a comunidade parasitária que os infeta) (Cox, 2001; Gause, Urban & Stadelcker, 2003; Bordes & Morand, 2009 a,b; Biard *et al.*, 2015).

Existe associação da espécie dos indivíduos à existência de parasitismo, sendo que 100% dos indivíduos analisados de *A. flammeus*, *A. gentilis*, *A. nisus*, *A. otus*, *B. buteo*, *B. oediacnemus*, *C. aeruginosus*, *F. columbarius*, *F. tinnunculus*, *G. chloropus*, *P. carbo* e *S. aluco* apresentavam parasitas, enquanto que apenas 50% de *M. migrans* e 33,3 % de *T. alba* o faziam. Nenhum exemplar de *A. fasciata*, *A. monachus*, *B. bubo*, *F. naumanni* e *G. fulvus* se encontrava parasitado ($p < 0,01$). Existe também associação quanto à localização dos parasitas, verificando-se que 100% dos indivíduos analisados de *A. flammeus*, *A. gentilis*, *B. oediacnemus*, *F. columbarius*, *G. chloropus* e *P. carbo*, 50% dos de *B. buteo* e *M. migrans*, 66,7% de *F. tinnunculus* e 33,3% de *T. alba* apresentavam parasitas com localização apenas gastrointestinal; a única espécie que apresenta localização exclusivamente hemática, com 33,3% dos indivíduos, é *F. tinnunculus*; e a totalidade de *A. nisus*, *A. otus*, *C. aeruginosus* e *S. aluco*, bem como 50% de *B. buteo*, apresentavam parasitas em localização tanto gastrointestinal como hemática ($p < 0,001$). Ambas as associações foram discutidas anteriormente, devendo-se à ausência de parasitismo dos animais em cativeiro (sendo *G. fulvus* a única exceção) e à maior exposição a formas infetantes de helminte das aves de certas espécies de rapinas diurnas e noturnas (Piersma, 1997; Snow *et al.*, 1998). A localização exclusivamente hemática foi observada em apenas um indivíduo e deve-se provavelmente à sua condição física ao invés da espécie em si. Não se verificou o mesmo em outros indivíduos da mesma espécie, que apresentavam todos parasitose gastrointestinal conforme o esperado (uma vez que se alimentam principalmente de pequenos roedores) (Snow *et al.*, 1998; Madroño *et al.*, 2004). Dos que apresentavam parasitas em ambas as localizações, 66,7% tinham *Capillaria* spp. como agente gastrointestinal e 83,3% tinham *Leucocytozoon* spp. como agente hemático, podendo existir alguma sinergia entre estas duas espécies em particular ou apenas a, já descrita, sinergia entre endo- e hemoparasitas (Cox, 2001; Druilhe, Tall & Sokhna, 2005; Telfer *et al.*, 2010; Bordes & Morand, 2011). Apesar de tudo isto, o valor reduzido da amostra (34 indivíduos) juntamente com o elevado número de classes utilizadas (19 espécies) dificulta a interpretação correta destes resultados.

Em relação às espécies de parasitas gastrointestinais e hemáticas existe também associação estatisticamente significativa. Encontrou-se *Capillaria* sp. na totalidade dos indivíduos de *A. flammeus*, *A. gentilis*, *A. nisus*, *B. buteo*, *C. aeruginosus*, *F. columbarius*, *G. chloropus* e *S. aluco*, bem como em 33,3% de *F. tinnunculus* e 50% de *M. migrans* e *P. carbo*; foram encontrados céstodes em 100% de *B. oediconemus* e 50% de *A. otus* e *B. bubo*; oocistos de coccídeos em 50% de *P. carbo* e *Sarcocystis* sp. em 50% de *A. otus* e em 33,3% de *F. tinnunculus* e *T. alba* ($p < 0,01$).

Sanmartín, Álvarez, Barreiro & Leiro (2004), analisaram 285 indivíduos de 14 espécies (8 das quais em comum com este trabalho) na Galiza. Das espécies comuns, foi encontrada *Capillaria tenuissima* em *B. buteo*, *A. nisus*, *F. tinnunculus*, *M. migrans*, *T. alba*, *S. aluco* e *A. otus*. A sua presença era escassa em *F. tinnunculus*, à semelhança do presente estudo, e inexistente em *A. gentilis*, ao contrário dos resultados obtidos. A prevalência em Strigiformes no trabalho mencionado é baixa, mas foi previamente reportada por Barus (1966), Okulewicz (1988) e Lierz *et al.* (2002). Em *G. chloropus*, Kinsella, Hon & Reed Jr. (1973) encontraram capilarídeos intestinais em 10,7% dos indivíduos. Borgsteede, Okulewicz, Zoun & Okulewicz (2003) encontraram *Capillaria* sp. em *B. buteo*, *A. nisus*, *F. tinnunculus*, *A. flammeus*, *S. aluco*, *T. alba* e *A. otus*. A infeção em *A. gentilis* encontra-se descrita por Clapham (1957) num único indivíduo. Não foi encontrada informação referente à infeção por *Capillaria* em *C. aeruginosus* e *F. columbarius*, podendo esta constituir uma primeira referência de parasitismo por este grupo de nemátodes em ambas as espécies de rapina. Em relação a *Sarcocystis* sp., encontra-se descrita a sua presença em Strigiformes, nomeadamente em *T. alba*, como hospedeiro definitivo. Nesse estudo, levado a cabo por Munday (1977), tentou-se ainda infetar experimentalmente um indivíduo *Accipiter* sp., sem sucesso. Existe registo de infeção de *F. tinnunculus* por *Sarcocystis cernae* devido a ingestão de Rato-do-campo-comum (*Microtus arvalis*), pequeno roedor e hospedeiro intermediário (Hoogenboom & Dijkstra, 1987). A infeção por céstodes (das Famílias Progynotaeniidae e Dilepididae) foi observada em *B. oediconemus* na Hungria por Murai, Sulgostowska & Tenora (1988).

Quanto aos hemoparasitas, encontrou-se *Leucocytozoon* sp. em 100% de *A. nisus*, *A. otus* e *S. aluco*, e em 50% de *B. buteo*. Encontrou-se *Plasmodium* sp. em 100% de *C. aeruginosus* e 33,3% de *F. tinnunculus* ($p = 0,04$). Não existe associação da espécie à presença de parasitose múltipla gastrointestinal ($p > 0,05$).

Encontra-se descrita a infeção por *Leucocytozoon danilewskyi* em *A. otus* e *T. alba* no artigo previamente citado de Krone *et al.* (2008). Sacchi & Prigioni (1984) encontraram esta espécie de hemoprotozoário em *B. buteo*, *A. nisus* e *S. aluco*. Quanto a *Plasmodium* sp., a sua

infecção foi observada em *F. tinnunculus* em Cabo Verde por Hille, Nash & Krone (2007). Não foi encontrada na literatura consultada qualquer referência a parasitismo por *Plasmodium* sp. em *C. aeruginosus* ou em *F. tinnunculus* (este último na Península Ibérica).

Em relação às associações entre a presença de particularidades da infecção parasitária e os parâmetros hematológicos, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a *existência de parasitismo* e o valor relativo de linfócitos sendo que, dentro dos animais parasitados, 71,4% apresentavam valores relativos de linfócitos reduzidos em relação aos valores de referência utilizados para a espécie, 14,3% apresentavam valores elevados e outros 14,3% apresentavam valores normais. Dos animais não parasitados, 66,7% apresentavam valores normais, 25% apresentavam valores reduzidos e 8,3% apresentavam valores elevados ($p = 0,02$). Esta associação não existe entre o parasitismo e o valor de hematócrito ($p > 0,05$), o RBCc ($p > 0,05$), o WBCc ($p > 0,05$), o valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de eosinófilos, valor relativo ($p > ,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de heterófilos, valor absoluto de linfócitos ($p > 0,05$) e rácio H/L ($p > 0,05$).

Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a localização dos parasitas e o valor relativo de linfócitos, verificando-se que dos animais que apresentavam parasitas com localização exclusivamente gastrointestinal, 75% apresentavam valores relativos de linfócitos reduzidos e 25% encontravam-se elevados. Nos casos de localização exclusivamente hemática, 100% apresentavam valores dentro dos intervalos normais. Nos casos em que se encontraram parasitas em ambas as localizações, 80% dos indivíduos apresentavam valores reduzidos, estando os outros 20% dentro do normal. ($p = 0,01$) Não foi encontrada associação entre a localização dos parasitas e o hematócrito ($p > 0,05$), o RBCc ($p > 0,05$), o WBCc ($p > 0,05$), o valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de eosinófilos, o valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de heterófilos, o valor absoluto de linfócitos ($p > 0,05$) e o rácio H/L ($p > 0,05$).

Não se verificou associação estatisticamente significativa entre a presença de parasitose múltipla gastrointestinal e os parâmetros testados: hematócrito ($p > 0,05$), RBCc ($p > 0,05$), WBCc ($p > 0,05$), valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de eosinófilos, valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de heterófilos, valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de linfócitos ou rácio H/L ($p > 0,05$).

Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre o agente parasitário gastrointestinal e o valor relativo de linfócitos, sendo que dos indivíduos parasitados por *Capillaria* sp., 77,8% apresentam valores relativos de linfócitos reduzidos, 11,1 % apresentam valores elevados e outros 11,1% apresentam valores dentro do intervalo normal para a espécie. A totalidade dos animais parasitados por céstodes e 66,7% dos parasitados por

Sarcocystis sp., apresentam valores reduzidos. Dos animais que não apresentavam nenhum parasita gastrointestinal, 69,2% apresentavam valores dentro do intervalo normal, 23,1% apresentavam valores reduzidos e 7,7% apresentavam valores elevados ($p = 0,01$). Não foi possível obter amostras de sangue dos animais que apresentavam oocistos de coccídeos, não se possuindo, portanto, informação em relação aos mesmos. Não existe associação entre o agente parasitário gastrointestinal e o hematócrito ($p > 0,05$), o RBCc ($p > 0,05$), o WBCc ($p > 0,05$), o valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de eosinófilos, o valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de heterófilos, o valor absoluto de linfócitos ($p > 0,05$) e o rácio H/L ($p > 0,05$).

Não se verificou associação estatisticamente significativa entre o agente parasitário hemático e nenhum dos parâmetros testados: hematócrito ($p > 0,05$), RBCc ($p > 0,05$), WBCc ($p > 0,05$), valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de eosinófilos, valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de heterófilos, valor relativo ($p > 0,05$) e absoluto ($p > 0,05$) de linfócitos e rácio H/L ($p > 0,05$).

A existência de associação entre o valor relativo de linfócitos e a existência de parasitismo, localização dos parasitas e género de endoparasita é curiosa e inesperada, e urge a investigação do potencial uso deste parâmetro como indicador de parasitose. As percentagens de valores relativos de linfócitos alterados observadas encontram-se representadas nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Percentagem de valores relativos de linfócitos alterado consoante a presença de parasitose.

Presença de parasitose	Linf. Rel. Reduzidos	Linf. Rel. Normais	Linf. Rel. Elevados
Sim	71,4%	14,3%	14,3%
Não	25%	66,7%	8,3%

Tabela 10. Percentagem de valores relativos de linfócitos alterados consoante a localização dos parasitas.

Localização de parasitas	Linf. Rel. Reduzidos	Linf. Rel. Normais	Linf. Rel. Elevados
Gastrointestinal	75%	0%	25%
Mista	80%	20%	0%
Sangue	0%	100%	0%

Os resultados são consistentes nos três parâmetros, sendo de salientar que, no caso dos animais parasitados, 71,4% apresentavam valores relativos de linfócitos reduzidos e 14,3% apresentavam valores normais. Dos animais não parasitados, 66,7% apresentavam valores normais e apenas 25% apresentavam valores reduzidos. Em relação à localização da infeção, 75% dos animais com localização gastrointestinal exclusiva e 80% dos animais com infeção mista tinham valores reduzidos. Nenhum animal com localização exclusivamente hemática tinha valores alterados. No que toca às espécies de endoparasita, 77,8% dos infetados por

Capillaria spp., 100% dos infetados por céstodes e 66,7% dos infetados por *Sarcocystis* spp. apresentavam valores reduzidos destes leucócitos. Dos animais que não apresentavam endoparasitas, 69,2% tinham valores normais de linfócitos. Não existia associação com a espécie de hemoparasitas, sugerindo que as alterações registadas estão relacionadas com a parasitose por helmintes, mas não por hemosporídeos. A proporção de animais com valor reduzido no caso das infeções mistas é superior, o que poderá ser tanto causa como consequência da co-infeção. Não existiu associação à parasitose múltipla gastrointestinal, o que sugere que as alterações se relacionam com a presença de helmintes no TGI, mas não com o poliparasitismo gastrointestinal. Provavelmente poderá estar mais dependente de alguns géneros/espécies que promovam esta baixa de linfócitos, embora não exista bibliografia que suporte esta suposição para todas as espécies analisadas (ver mais abaixo estudo de Biard, Monceau, Motreuil & Moreau (2015)).

Vários estudos salientam a importância da consideração da comunidade parasitária do hospedeiro aquando da interpretação de indicadores imunológicos. A dúvida persiste entre a interpretação das variações destes índices como indicadores de imunocompetência ou de ativação do sistema imunitário em resposta à infeção. A interpretação dos dados obtidos é dificultada pelo fato de a grande parte dos estudos se focar numa única espécie ou género parasitário, em hospedeiros nos quais se observou já a coexistência de diferentes parasitas em várias localizações (Holmstad & Skorping, 1998; Cox, 2001; Holmstad, Jensen & Skorping, 2008; Bordes & Morand, 2009 a, b; Biard *et al.*, 2010; Krasnov, Shenbrot & Khokhlova, 2011). O presente estudo tem limitação também neste aspeto, por não terem sido tomados em conta os ectoparasitas dos animais amostrados, devido à escassez de tempo para o mesmo.

No estudo de Biard *et al.* (2015), efetuado no Melro comum (*Turdus merula*), foi observada variação nas relações entre a infeção e os indicadores imunológicos conforme a espécie de parasita considerada, a existência de poliparasitismo e a carga parasitária do hospedeiro. Observou-se, no entanto, variação do rácio H/L, particularmente nas co-infeções por *Hymenolepis* sp. e *Plasmodium* sp., bem como alterações na proporção de linfócitos, heterófilos e monócitos. Foi concluído que a interpretação de um índice em particular depende de quais os parasitas presentes, refletindo os efeitos cumulativos combinados de todos e não de um único. A ausência de associações poderá dever-se a uma outra espécie presente, não considerada, que interaja com uma das partes da associação e altere a sua interpretação.

Outros estudos sugerem o uso de índices imunes de forma a explorar os padrões de coinfeção e as dinâmicas entre parasitas (Bradley & Jackson, 2008) ou a consideração de vários índices e sua variação temporal e espacial para obter um conhecimento mais profundo

da imunocompetência dos indivíduos (Boughton, Joop & Armitage, 2011; Pigeon et al., 2013; Brock, Murdock & Martin, 2014).

Voltando à análise dos resultados obtidos, a linfopénia em si é uma alteração pouco provável, já que está normalmente associada a um excesso de corticosteroides endógenos ou exógenos e a processos virais e de endotoxémia graves (Clark, *et al.*, 2009; Carpenter, 2013; Jones, 2015). Apesar do stress a que muitos destes animais se encontravam expostos, os valores absolutos encontravam-se dentro dos parâmetros normais na maioria das situações, por isso é muito provável que se trate de uma redução apenas da sua proporção devido a um aumento relativo, ligeiro o suficiente para não sair dos intervalos de referência utilizados, de heterófilos, monócitos e eosinófilos (considera-se o aumento simultâneo uma vez que as proporções entre estes não se alteraram, sendo linfócitos o único valor relativo reduzido). Outra possibilidade será que, uma vez que a resposta à infeção parasitária é mediada predominantemente por linfócitos T, conforme o momento da infeção em que é efetuada a colheita de sangue estas células podem encontrar-se reduzidas na corrente sanguínea (Gause *et al.*, 2003).

Como foi anteriormente descrito, o impacto da infeção parasitária na resposta imune não consiste tanto na alteração da população leucocitária como na alteração dos seus mecanismos de resposta, sendo possível que as alterações nas suas proporções sejam muito reduzidas (pelo menos até uma determinada carga parasitária) (Bentwich *et al.*, 1999; Cox, 2001; Gause *et al.*, 2003; Druilhe, Tall & Sokhna, 2005). Estas alterações poderão estar relacionadas também, em parte, com o quadro clínico dos animais amostrados, uma vez que a maioria ingressou devido a traumatismo ou debilidade e que muitos apresentavam processos infecciosos agudos ou crónicos. Como descrito na revisão bibliográfica, estes processos causam o aumento relativo dos heterófilos e dos monócitos (estes últimos no caso particular de processos arrastados) (Tabelas 2 e 3). Se esta possibilidade estiver correta, a associação apenas à proporção reduzida de linfócitos poderá indicar um aumento ligeiro de eosinófilos, que se poderá dever ao parasitismo em si à semelhança do que ocorre em mamíferos (Krautwald-Junghanns, 2007; Samour & Pendl, 2009a; Jones, 2015; Doneley, 2016).

Há que ter em conta que os intervalos utilizados se baseiam em estudos cuja amostra era, na maior parte dos casos, reduzida e muito homogénea (apenas adultos de um determinado género ou pertencentes a uma população ou área geográfica restrita, diferente da do presente estudo). Além disso foi necessário recorrer a substituições por valores de espécies filogeneticamente aproximadas (como descrito no procedimento experimental) nos casos em que os parâmetros não se encontravam estudados, o que dificulta a interpretação das variações dos índices imunológicos.

5. Conclusão

Do total de animais analisados e resultados obtidos, destaca-se a prevalência de infecção por parasitas gastrointestinais de 58,82% face aos 23,3% de prevalência de hemoparasitas.

O parasita gastrointestinal mais frequentemente encontrado tanto nas infecções simples como mistas foi *Capillaria* sp e o hemoparasita mais prevalente foi *Leucocytozoon* sp.

Foram mais frequentes os casos de poliparasitismo com localização mista (gastrointestinal e hemática) do que a coinfeção por parasitas do mesmo grupo, o que sugere a atuação de endoparasitas gastrointestinais como promotores do estabelecimento de hemoparasitose. Tal não acontece com outros parasitas do mesmo tipo, possivelmente porque a resposta imune que desencadeiam impede as formas larvares de outros endoparasitas de estabelecerem infecção.

Constatou-se que a dieta, habitat e hábitos sociais dos animais amostrados são fatores determinantes da infecção e localização parasitária. A localização exclusivamente gastrointestinal foi a mais observada, seguida da localização hemática e gastrointestinal, tendo sido mais rara a infecção exclusivamente hemática.

O presente estudo sugere que a causa de ingresso e a condição clínica do animal podem estar associados à localização dos parasitas, respetivas espécies e carga parasitária, bem como à existência de poliparasitismo. Sugere ainda que o fator mais importante é a capacidade imunitária do indivíduo, que pode ser influenciada pela existência de debilidade.

Este estudo sugere a hipótese de uma possível utilização da proporção relativa das várias linhas leucocitárias e sua variação como possível indicador hematológico de parasitose. Efetivamente, foram encontrados valores reduzidos de linfócitos relativos em 71,4% dos animais parasitados, face a 25% dos animais não parasitados (dos quais outros 66,7% apresentavam valores normais). No entanto, não houve associação do parasitismo a alteração dos valores absolutos de linhas leucocitárias. É, assim, igualmente possível que a alteração se deva à diminuição de linfócitos ou ao aumento ligeiro de heterófilos, eosinófilos e monócitos.

No presente estudo estas alterações parecem ocorrer apenas na presença de endoparasitas e são aparentemente mais comuns nas infecções com localização mista (80%) que nas exclusivamente gastrointestinais (75%). Não se encontrou associação com o poliparasitismo gastrointestinal, o que sugere que as alterações se relacionam com a presença de endoparasitas, mas não com a co-infecção por estes. No entanto, não é claro se as alterações encontradas são causa ou consequência do poliparasitismo.

É provável que os índices imunitários reflitam os efeitos combinados da comunidade parasitária presente, correspondendo aos efeitos cumulativos de todos e não de uma espécie ou localização em concreto.

6. Perspectivas e recomendações futuras

Conforme o descrito na Conclusão, salienta-se a importância de considerar toda a comunidade parasitária do hospedeiro aquando da investigação e interpretação de indicadores de parasitose. Para melhor se investigar estes indicadores e sua variação consoante as características do parasitismo, será aconselhável que a amostra e período de estudo sejam superiores aos utilizados. Será também útil restringir a amostra a espécies ou ordens concretas de hospedeiros, e considerar toda a sua comunidade parasitária (ecto- e endoparasitas, incluindo os hemoparasitas).

Finalmente, podemos colocar a hipótese que o uso de amostragem superior à utilizada no presente estudo poderia ter levado a uma variação ou confirmação dos resultados obtidos.

Considera-se que o presente estudo forneceu novos dados e que poderá ser base para uma futura investigação deste tema. Durante a execução deste trabalho levantaram-se novas questões sobre a interação de vários géneros parasitários, sua influência na capacidade imunitária e seus indicadores em espécies de aves.

Tanto as aves como as espécies parasitárias são excelentes indicadores do estado do ecossistema que habitam, sendo um reflexo da saúde do mesmo, pelo que a obtenção de métodos para o seu estudo é fundamental.

No caso particular da fauna parasitológica, a informação obtida vai além das espécies de hospedeiro e parasita estudadas, uma vez que os dados refletem toda a cadeia alimentar e ecossistema local (disponibilidade de presas, outra fauna local e qualidade do habitat). Por esta razão, a obtenção de mais informações nesta área poderá levar a uma deteção atempada de alterações no ecossistema e facilitar uma resposta adequada às mesmas.

Referências bibliográficas

- Acosta, I., Hernández, S., Gutiérrez, P. N., Martínez-Cruz, M. S., Hernández, E., Buffoni, L., & Javier Martínez-Moreno, F. (2010). Acuaroid nematodes in the common kestrel (*Falco tinnunculus*) in the south of Spain. *Veterinary Journal*, 183 (2), 234–237.
- Ahmed, F. E. & Mohammed, A. H. H. (1978). Haemoproteus columbae: Course of infection, relapse and immunity to reinfection in the pigeon. *Zeitschrift Für Parasitenkunde Parasitology Research*, 57(3), 229–236.
- Álvarez, F., Sánchez, C., & Angulo, S. (2005). Small, fat male moorhens *Gallinula chloropus* are healthier. *Ardeola*, 52(2), 279-285.
- Ammersbach, M., Beaufrère, H., Gionet Rollick, A., & Tully, T. (2015). Laboratory blood analysis in Strigiformes—Part I: hematologic reference intervals and agreement between manual blood cell counting techniques. *Veterinary clinical pathology*, 44(1), 94-108.
- Anderson, R. C., Chabaud, A. G. & Willmott, S. (2009). *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates: Archival Volume*. Wallingford, UK: CAB International, pp. 480
- Anderson, R. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. (R. Anderson, Ed.) (2nd Ed., p. 650). Wallingford: CABI Publishing.
- Antunes, A.F.N. (2016). *Pesquisa de helmintes gastrointestinais em quatro espécies de aves de rapina na zona centro de Portugal. Buteo buteo, Falco tinnunculus, Tyto alba e Athene noctua*. Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
- Atkinson, C. T. (2008). Haemoproteus. In Atkinson C. T., Thomas, N.J., Hunter D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds* (pp. 13-34). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Atkinson, C. T., & Van Riper III, C. (1991). Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution, and Behaviour*, 19-48.
- Atkinson, C. T. & Forrester, D.J. (1987). Myopathy Associated with Megaloschizonts of Haemoproteus meleagridis in a Wild Turkey from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 23(3), 495-498.
- Barger, A. M., & MacNeill, A. L. (Eds.). (2015). *Clinical Pathology and Laboratory Techniques for Veterinary Technicians*. John Wiley & Sons.
- Barus, V. (1966). Parasitic nematodes of birds in Czechoslovakia. I. Hosts: Columbiformes, Piciformes, Falconiformes and Strigiformes. *Folia Parasitologica*, 13(1), 7–27.

- Bentwich, Z., Kalinkovich, A., Weisman, Z., Borkow, G., Beyers, N., & Beyers, A. D. (1999). Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? *Immunology today*, 20(11), 485-487.
- Biard, C., Monceau, K., Motreuil, S. & Moreau, J. (2015). Interpreting immunological indices: the importance of taking parasite community into account. An example in blackbirds *Turdus merula*. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 960-972.
- Biard, C., Saulnier, N., Gaillard, M. & Moreau, J. (2010) Carotenoid-based bill colour is an integrative signal of multiple parasite infection in blackbird. *Naturwissenschaften*, 97, 987–995.
- Black, P. A., McRuer, D. L., & Horne, L. A. (2011). Hematologic parameters in raptor species in a rehabilitation setting before release. *Journal of avian medicine and surgery*, 25(3), 192-198.
- Blas, J., Baos, R., Bortolotti, G. R., Marchant, T. A., & Hiraldo, F. (2006). Age-related variation in the adrenocortical response to stress in nestling white storks (*Ciconia ciconia*) supports the developmental hypothesis. *General and comparative endocrinology*, 148(2), 172-180.
- Bordes, F. & Morand, S. (2009a) Coevolution between multiple helminth infestations and basal immune investment in mammals: cumulative effects of polyparasitism? *Parasitology Research*, 106, 33–37.
- Bordes, F. & Morand, S. (2009b) Parasite diversity: an overlooked metric of parasite pressure. *Oikos*, 118, 801–806.
- Bordes, F., & Morand, S. (2011). The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology & Epidemiology*, 1(1), 7346.
- Borgsteede, F., Okulewicz, A., Zoun, P.E. & Okulewicz, J. (2003). The fauna of birds of prey (Accipitriformes, Falconiformes, and Strigiformes) in the Netherlands. *Acta Parasitologica*, 48, 200–207.
- Boughton, R., Joop, G. & Armitage, S. (2011) Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. *Functional Ecology*, 25, 81–100.
- Bowman, D. D. (2009). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. (9th ed.). Philadelphia, EUA: Saunders Elsevier
- Bradley, J. & Jackson, J. (2008) Measuring immune system variation to help understand host-pathogen community dynamics. *Parasitology*, 135, 807–823

- Brock, P., Murdock, C. & Martin, L. (2014) The history of ecoimmunology and its integration with disease ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 54, 353–362.
- Brown, C. (2007). Venipuncture in psittacine birds. *Lab animal*, 36(10), 21.
- Brown, J., Hatt, M., & Jones M. (Eds), (2009, March). *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting* pp,513- 523. Antwerp, BE.
- Campbell T. W. (1994). Hematology. In: Ritchie B. W., Harrison G. J., Harrison L. R. (Eds.). *Avian medicine: principles and application* pp. 176–98. Lake Worth (FL): Wingers Publishing.
- Campbell, T. W. (1995). *Avian hematology and cytology (2nd Ed.)*. Iowa State University Press.
- Campbell, T. W., Ellis, C. K. (2007). *Avian and Exotic Animal Hematology and Citology (3rd Ed.)*. Iowa State University: Blackwell Publishing. pp. 3-50.
- Campbell, T. W., & Ellis, C. K. (2013). *Avian and exotic animal hematology and cytology*. John Wiley & Sons.
- del Campillo, M. C., Castañón, L., & Reguera, A. (1994). Índice-catálogo de zooparasitos ibéricos. León, *Universidad de León, Secretariado de Publicaciones*.
- Campo, J. L., & Davila, S. G. (2002). Changes in heterophil to lymphocyte ratios in heat-stressed chickens in response to dietary supplementation of several related stress agents. *Archiv fur Geflugelkunde*, 66(2), 80-84.
- Cannell B. L., Krasnec K. V., Campbell K., Jones H. I., Miller R. D., Stephens N. (2013) The pathology and pathogenicity of a novel Haemoproteus spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). *Veterinary Parasitology*, 197, 74-84.
- Cardona C. J., Ihejirika A., McClellan L. (2002). Haemoproteus lophortyx infection in Bobwhite Quail. *Avian Diseases*, 46, 249-55.
- Carrega, S.P.O. (2016). *Parasitismos gastrointestinal em aves de rapina num centro de recuperação de animais silvestres*. Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Carreno, R. A. (2008). Dispharynx, Echinuria, and Streptocara. In Atkinson, C. T., Thomas, N.J., Hunter, D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 326-342). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Carpenter, J. W. (2013). *Exotic animal formulary*. Elsevier Health Sciences.

- Cital, S., M Lennox, A., & Goodnight, A. (2016). Avian Transfusion Medicine. *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking*, 334-344.
- Clark, P. (2015). Observed variation in the heterophil to lymphocyte ratio values of birds undergoing investigation of health status. *Comparative Clinical Pathology*, 24(5), 1151-1157.
- Clark, P., Boardman, W., & Raidal, S. (2009). *Atlas of clinical avian hematology*. John Wiley & Sons.
- Coles, B. H. (2007). *Diversity in anatomy and physiology: clinical significance*. In *Essentials of avian medicine and surgery*. (3rd ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Costa, H., de Juana Aranzana, E., & Simó, J. M. V. (2011). *Aves de Portugal: incluindo os arquipélagos dos Açores, da Madeira e das Selvagens*. Lynx Edicions.
- Cox, F.E. (2001) Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122 (S1), S23–S38.
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760-772.
- Davidar, P., & Morton, E. S. (2006). Are multiple infections more severe for Purple Martins (*Progne subis*) than single infections? *The Auk*, 123(1), 141-147.
- Del Cerro, S., Merino, S., Martínez-de la Puente, J., Lobato, E., Ruiz-de-Castañeda, R., Rivero-de Aguilar, J., ... & Moreno, J. (2010). Carotenoid-based plumage colouration is associated with blood parasite richness and stress protein levels in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Oecologia*, 162(4), 825-835.
- Dohms, J. E., & Metz, A. (1991). Stress mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30(1), 89-109.
- Doneley, B. (2016). *Avian medicine and surgery in practice: companion and aviary birds*. CRC press.
- Dorrestein, G. M. (2009). Passerines and exotic softbills. In Tully, T., Dorrestein, G., & Jones, A. (Eds.), *Handbook of Avian Medicine (2nd Ed.)*. Oxford, UK: Saunders Ltd.
- Druilhe, P., Tall, A., & Sokhna, C. (2005). Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? *Trends in parasitology*, 21(8), 359-362.

- Dyer, S. M., & Cervasio, E. L. (2008). An overview of restraint and blood collection techniques in exotic pet practice. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 423-443.
- Echols, S. (1999). Collecting diagnostic samples in avian patients. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2(3), 621-50.
- Fair, J., Whitaker, S., & Pearson, B. (2007). Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis*, 149(3), 535-552.
- Fagerholm, H. P. & Overstreet, R. M. (2008). Ascaridoid Nematodes: Contracaecum, Porrocaecum, and Baylisascaris. In Atkinson C. T., Thomas, N. J., Hunter D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 413-433). Iowa, EUA: Wiley-Blackwell
- Fagerholm, H. P., & Robin, O. M. (2008). Ascaridoid nematoids: Contracaecum, Porrocaecum and Baylisascaris. In Atkinson C. T., Thomas, N.J., Hunter D. B. (Eds.), *Parasitic diseases of wild birds* (pp. 413-433). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Fagerholm, H. P. (1996). Nematode parasites of marine and shore birds and their role as pathogens. *Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology*, 6(2), 16-30.
- Fernández, A. R. M., Alvarez, A. M. & Martin, F. S. (1999). Diagnóstico de las parasitosis. In Borchert, A. & Del Campillo, M. (Eds.), *Parasitología veterinaria (1st Ed.)*. (pp. 158-177). Madrid: McGraw-Hill.
- Fernando, M.A. & Barta, J.R. (2008). Tracheal Worms. In Atkinson C. T., Thomas, N.J., Hunter D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 343-354). Iowa, EUA: Wiley-Blackwell
- Ferrer, D., Molina, R., Adelantado, C., & Kinsella, J. M. (2004). Helminths isolated from the digestive tract of diurnal raptors in Catalonia, Spain. *Veterinary Record*, 154(1), 17-20.
- Ferrer, D.R., Molina, R., Castellà, J. & Kinsella, J.M. (2004). Parasitic helminths in the digestive tract of six species of owls (Strigiformes) in Spain. *The Veterinary Journal*, 167, 181-185.
- Fourie, F. L. R., & Hattingh, J. (1980). Variability in bird haematology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 65(1), 147-150.
- Forrester D. J., Greiner E. C. (2008). Leucocytozoonosis. In Atkinson, C. T., Thomas, N. J., Hunter D. B. (Eds.). (2008). *Parasitic Diseases of Wild Birds* pp. 54-107. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Fromont, E. (1993). *Hématologie et parasites sanguins des rapaces: étude chez les oiseaux en réhabilitation*.

- Gallo, L., Quintana, F., Svagelj, W. S., & Uhart, M. (2013). Hematology and blood chemistry values in free-living imperial cormorants (*Phalacrocorax atriceps*). *Avian diseases*, 57(4), 737-743.
- Garcês, A. & Pires, I. (2017). *Manual de Técnicas de Necrópsia em Animais Selvagens*. Arteology.
- García-Montijano, M., García, A., Lemus, J. A., Montesinos, A., Canales, R., Luaces, I., & Pereira, P. (2002). Blood chemistry, protein electrophoresis, and hematologic values of captive Spanish imperial eagles (*Aquila adalberti*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33(2), 112-117.
- Garvin M. C., Greiner E. C. (2003) Epizootiology of *Haemoproteus danieliewskyi* in blue-jays (*Cyanocitta cristata*) in southcentral Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 39, 1-9.
- Gasser, R. B. (2006). Molecular tools: advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology* 136(2), 69-89.
- Gause, W. C., Urban, J. F., & Stadecker, M. J. (2003). The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends in immunology*, 24(5), 269-277.
- Gibbons, L. M. (Ed.) (2010). *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Supplementary Volume*. CABI.
- Goater, T. M., Goater, C. P., & Esch, G. W. (2013). *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press.
- Gosden, C. (2004). *Exotics and wildlife*. Butterworth Heinemann.
- Green, R. E., Tyler, G. A., & Bowden, C. G. R. (2000). Habitat selection, ranging behaviour and diet of the stone curlew (*Burhinus oedicephalus*) in southern England. *Journal of Zoology*, 250(2), 161-183.
- Greiner, E. C., & Ritchie, B. W. (1994). Parasites. In Ritchie, B. W., Harrison, G. J., & Harrison, L. R. (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application* (pp. 1007-1029). Lake Worth, FL: Wingers Publishing.
- Greiner, E. C. (2008). Isospora, Atoxoplasma, and Sarcocystis. In Atkinson C. T., Thomas, N.J., Hunter D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds (1st. Ed.)*. (pp. 108– 119). Iowa, EUA: Wiley-Blackwell.
- Gross, W. B., & Siegel, H. S. (1983). Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian diseases*, 972-979.

- Guzman D. S. M., Mitchell M. A., Gaunt S. D., Beaufrère H., & Tully T. N. (2008). Comparison of hematologic values in blood samples with lithium heparin or dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid coagulants in hispaniolan amazon parrots (*Amazona ventralis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22(2), 108-113.
- Harris D. J. (2009). Clinical tests. In T. N. Tully, G. M. Dorrestein & S. K. Jones (Eds.), *Handbook of Avian Medicine (2nd Ed.)*. (pp. 43-51). Oxford: Saunders Elsevier.
- Hawkey, C. M., Samour, J. H. (2008). The value of clinical hematology in exotic birds. In Jacobson, E. R., Kollias G. V. Jr. (Eds.), *Exotic animals: contemporary issues in small animal practice* (pp 109–141). New York, NY.
- Hellgren, O., Pérez-Tris, J., & Bensch, S. (2009). A jack- of- all- trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology*, 90(10), 2840-2849.
- Hernández, M., & Margalida, A. (2010). Hematology and blood chemistry reference values and age-related changes in wild bearded vultures (*Gypaetus barbatus*). *Journal of wildlife diseases*, 46(2), 390-400.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., L'Anson, H., & David, J. (2006). *Integrated principles of zoology (Vol. 15)*. New York, NY: McGraw-Hill.
- Hille, S. M., Nash, J. P., & Krone, O. (2007). Hematozoa in endemic subspecies of common kestrel in the Cape Verde Islands. *Journal of wildlife diseases*, 43(4), 752-757.
- Holmstad, P.R. & Skorpung, A. (1998) Covariation of parasite intensities in willow ptarmigan, *Lagopus lagopus* L. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 1581– 1588.
- Holmstad, P. R., Hudson, P. J., & Skorpung, A. (2005). The influence of a parasite community on the dynamics of a host population: a longitudinal study on willow ptarmigan and their parasites. *Oikos*, 111(2), 377-391.
- Holmstad, P.R., Jensen, K.H. & Skorpung, A. (2008) Ectoparasite intensities are correlated with endoparasite infection loads in willow ptarmigan. *Oikos*, 117, 515–520.
- Hoogenboom, I., & Dijkstra, C. (1987). *Sarcocystis cernae*: a parasite increasing the risk of predation of its intermediate host, *Microtus arvalis*. *Oecologia*, 74(1), 86-92.
- Howlett, J. C., Bailey, T. A., Samour, J. H., Naldo, J. L., & D'Aloia, M. A. (2002). Age-related hematologic changes in captive-reared houbara, white-bellied, and rufous-crested bustards. *Journal of wildlife diseases*, 38(4), 804-816.
- Huffman, J. E. (2008). Trematodes. In Atkinson, C. T., Thomas, N. J. & Hunter, D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 225-245). Iowa, USA: Wiley-Blackwell

- ICNF. (s.d.). *Plano Setorial - Fichas de caracterização ecológica e de gestão das espécies de Aves*. Retirado de <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/rn2000/p-set/psrn-aves#F>
- Illescas, G., Rodriguez, O., & Aranda, M. (1993). Parasitacion of falconiform, strigiform and passeriform (Corvidae) birds by helminths in Spain. *Research and Reviews in Parasitology*, 53(3-4), 129-135.
- Jennings, I. B. (1996). Haematology. In Beynon P. H., Forbes, N. A., & Harcourt-Brownm, N. H. *Manual of raptors, pigeons and waterfowl*, Cheltenham, UK, British Small Animal Veterinary Association, 68–78.
- Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Hartmann, K., & Mooers, A. O. (2012). The global diversity of birds in space and time. *Nature*, 491(7424), 444-448.
- Jones, M. P. (2015). Avian hematology. *Clinics in laboratory medicine*, 35(3), 649-659.
- Keller, T. M., & Visser, G. H. (1999). Daily energy expenditure of great cormorants *Phalacrocorax carbo sinensis* wintering at Lake Chiemsee, southern Germany. *Ardea*, 87(1), 61-69.
- Kinsella, J. M., Hon, L. T., & Reed Jr, P. B. (1973). A comparison of the helminth parasites of the common gallinule (*Gallinula chloropus cachinnans*) and the purple gallinule (*Porphyryla martinica*) in Florida. *American Midland Naturalist*, 467-473.
- Klüh, P. N. (1994). *Studies on therapy for and prophylaxis of Caryospora infections in falcons (Falconiformes: Falconidae) with toltrazuril and the description of two new strains of Caryospora (C. megafalconis n. sp. and C. Boeri n. sp.)*.
- Kirkwood, J. K., Cooper, J. E., & Brown, G. (1979). Some haematological data for the European kestrel (*Falco tinnunculus*). *Research in veterinary science*, 26(2), 263.
- Krautwald-Junghanns, M. (2007). Aids to Diagnosis. In B.H. Coles (Eds.), *Essentials of avian medicine and surgery*. (3rd Ed). (pp. 56-102). Oxford, Iowa, Victoria: Blackwell Publishing.
- Krone, O. (2000). Endoparasites in free-ranging birds of prey in Germany. In Lumeij, J. T., Remple, J.D., Redig, P. T., Lierz, M. & Cooper, J. E. (Eds.), *Raptor Biomedicine III*. (pp. 101-116). Florida, USA: Zoological Education Network, pp. 476.
- Krone, O., Waldenström, J., Valkiūnas, G., Lessow, O., Müller, K., Iezhova, T. A., ... & Bensch, S. (2008). Haemosporidian blood parasites in European birds of prey and owls. *Journal of Parasitology*, 94(3), 709-715.

- Krone, O. (2002). Fatal Caryospora infection in a free-living juvenile Eurasian kestrel (*Falco tinnunculus*). *Journal of Raptor Research*, 36(1), 84–86.
- Krone, O. & Cooper, J. E. (2002). Parasitic diseases. In Cooper, J. E. (Ed.), *Birds and prey: Health & disease (3th ed.)*. (pp. 105-120). Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing.
- Krone, O. (2007). Pathology: endoparasites. In Bird, D. M. & Bildstein, K. L., *Raptor Research and Management Techniques*. (pp. 318-327). Washington, D.C.: Raptor Research Foundation
- Kuchta, R., Scholz, T., Brabec, J. & Bray, R.A. (2008). Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *International Journal for Parasitology*, 38, 49– 55.
- Kuiken, T., & Danesik, K. L. (1999). Hematology and serum chemistry of captive juvenile double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). *The Canadian Veterinary Journal*, 40(7), 493.
- Kutzer, E., Frey, H. & Kotremba, J. (1980). Zur Parasitenfauna österreichischer Greifvögel (Falconiformes). [Parasitic fauna of birds of prey (Falconiformes) in Austria]. *Angewandte Parasitologie*, 21, 183–205.
- Lacina, D. & Bird, D. M. (2000). Endoparasites of raptors: A review and an update. In Lumeij, J. T. Remple, J. D., Redig, P. T., Lierz, M. & Cooper, J. E. (Eds.), *Raptor Biomedicine III*. (pp. 65-99). Florida, USA: Zoological Education Network, pp. 476.
- Lavin, S., Cuenca, R., Marco, I., Velarde, R., & Vinas, L. (1992). Hematology and blood chemistry of the marsh harrier (*Circus aeruginosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Physiology*, 103(3), 493-495.
- Lichtenberger, M. K., Chavez, W., ..., & Cray, C. (2003). Mortality and response to fluid resuscitation after acute blood loss in mallard ducks (*Anas platythynchos*). *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*. 7–10.
- Lierz M, Gobel T, Schuster R (2002) Untersuchungen zum Vorkommen von Parasiten bei einheimischen Greifvögeln und Eulen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 115, 43–52
- Limíñana, R., López-Olvera, J. R., Gallardo, M., Fordham, M., & Urios, V. (2009). Blood chemistry and hematologic values in free-living nestlings of Montagu's Harriers (*Circus pygargus*) in a natural habitat. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(4), 687-695.

- Lentfer, T. L., Pendl, H., Gebhardt-Henrich, S. G., Fröhlich, E. K. F., & Von Borell, E. (2015). H/L ratio as a measurement of stress in laying hens—methodology and reliability. *British poultry science*, 56(2), 157-163.
- Locker, E.S. & Hofkin, B.V. (2015). *Parasitology: a conceptual approach*. New York & London: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, pp. 550.
- Madroño, A., González, G. G., & Atienza, J. C. (Eds.). (2004). *Libro rojo de las aves de España*. Organismo Autónomo Parques Nacionales.
- Magalhães, N. S. T., Gonçalves, A. I. R., Afonso-Roque, M., & Madeira de Carvalho, L. M. (1998). *Contribuição para o estudo da helmintofauna das aves de rapina de centros de recuperação em Portugal*.
- Martin, L. B., Scheuerlein, A., & Wikelski, M. (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society of London, B. Biological Sciences*, 270(1511), 153-158.
- Martinsen, E. S., Blumberg, B. J., Eisen, R. J., & Schall, J. J. (2008). Avian hemosporidian parasites from northern California oak woodland and chaparral habitats. *Journal of wildlife diseases*, 44(2), 260-268.
- Maxwell, M. H. (1993). Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal*, 49(1), 34-43.
- McLaughlin, J. D. (2008). Cestodes. In Atkinson, C. T., Thomas, N. J., & Hunter, D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 261-276). Iowa, USA: Wiley-Blackwell, pp. 592.
- Melvin, D. M., & Brooke, M. M. (1982). *Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites*. US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Laboratory Improvement Program Office, Laboratory Training and Consultation Division.
- Minias, P., Kaczmarek, K., Janiszewski, T., & Markowski, J. (2013). Hematology and plasma biochemistry values of Great Cormorant (*Phalacrocorax carbo sinensis*) nestlings. *Journal of wildlife diseases*, 49(1), 194-196.
- Molina-López, R. A., Casal, J., & Darwich, L. (2011). Causes of morbidity in wild raptor populations admitted at a wildlife rehabilitation centre in Spain from 1995-2007: a long-term retrospective study. *PLoS One*, 6(9), e24603.
- Montijano, M. G., López, I. L., Morena, M. A. & Atienza, J. C. (2004). Hematología y electroforesis de proteínas plasmáticas en Cernícalos Primilla (*Falco naumanni*) salvajes. In *Actas del VI Congreso Nacional sobre el Cernícalo Primilla*, Zaragoza, 13-15 Febrero 2004, pp.198-201.

- Müller, C., Jenni-Eiermann, S., & Jenni, L. (2011). Heterophils/Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Functional Ecology*, 25(3), 566-576.
- Murai, É., Sulgostowska, T., & Tenora, F. (1988). Tapeworm parasites of *Burhinus oedicnemus* (L., 1758) in Hungary (Cestoda: Progynotaeniidae and Dilepididae). *Acta Zoologica Hungarica*.
- Okulewicz, A. (1988). Nematodes in Falconiformes and Strigiformes of Lower Silesia (in Polish). *Wiad Parazytol* 34, 137–149
- Parga, M. L., Pendl, H., & Forbes, N. A. (2001). The effect of transport on hematologic parameters in trained and untrained Harris's hawks (*Parabuteo unicinctus*) and peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 15(3), 162-169.
- Polo, F. J., Celdran, J. F., Peinado, V. I., Viscor, G., & Palomeque, J. (1992). Hematological values for four species of birds of prey. *The condor*, 94(4), 1007-1013.
- Pendl, H. (2006). Morphological changes in red blood cells of birds and reptiles and their interpretation. *International Journal of Veterinary Medicine*, 61(1), 1-12.
- Samour, J. H., Howlett, J. C., Silvanose, C., Bailey, T. A., & Wernery, U. (1998). Normal haematology and blood chemistry of captive adult stone curlews (*Burhinus oedicnemus*). *Comparative Haematology International*, 8(4), 219-224.
- Samour, J. & Pendl, H. (2009a). Avian hematology. In Martel, A., Bailey, T., Chitty, J., Harcourt-Brown, N., Hatt, J. M., & Jones, M. (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting, Antwerp, 17th – 21st March 2009*, pp,513- 523
- Samour, J. & Pendl, H. (2009b). The value of hematology in avian clinical practice. In Martel, A., Bailey, T., Chitty, J., Harcourt-Brown, N., Hatt, J.M., & Jones, M. (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting, Antwerp, 17th – 21st March 2009*, pp,283-289
- Sanmartín, M. L., Alvarez, F., Barreiro, G., & Leiro, J. (2004). Helminth fauna of Falconiform and Strigiform birds of prey in Galicia, Northwest Spain. *Parasitology Research*, 92(3), 255-263.
- Santoro, M., Triepi, M., Kinsella, J. M., Panebianco, A., & Mattiucci, S. (2010). Helminth infestation in birds of prey (Accipitriformes and Falconiformes) in Southern Italy. *The Veterinary Journal*, 186(1), 119-122.

- Shen, X., Zhang, Z., Jia, B., Tu, Y. & Tian, Y. (2008). Blood Cell Morphology, Some Hematological and Serum Biochemistry Values of Common Kestrel (*Falco tinnunculus*). *Journal of Sustainable Development*, 2(1), 123-128.
- Peirce, M.A., Lederer, R. D., Adlard, R.D., & O'Donoghue, P. J. (2004). Pathology associated with endogenous development of haemoatozoa in birds from southeast Queensland. *Avian Pathology*, 33, 445-50.
- Perera, A., Maia, J. P. M. C., Jorge, F., & Harris, D. J. (2013). Molecular screening of nematodes in lacertid lizards from the Iberian Peninsula and Balearic Islands using 18S rRNA sequences. *Journal of Helminthology*, 87(2), 189–94.
- Clapham, P. A. (1957). Helminth parasites in some wild birds. *Bird study*, 4(4), 193-196.
- Pigeon, G., Bélisle, M., Garant, D., Cohen, A. A., & Pelletier, F. (2013). Ecological immunology in a fluctuating environment: an integrative analysis of tree swallow nestling immune defense. *Ecology and evolution*, 3(4), 1091-1103.
- Powers, L., Pokras, M.; Rio, K., Viverette, C., & Goodrich, L. (1994). Hematology and occurrence of hemoparasites in migrating Sharp-shinned Hawks. *J. Raptor Res.*, 28(3), 178-185.
- Quesenberry, K. E., & Hillyer, E. V. (1994). *Supportive care and emergency therapy*. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth, FL: Wingers, 382, 416.
- Redig, P.T. & Ackerman, J. (2000). Raptors. In Tully, T. N., Dorrestein, G. M., & Jones, A. K., *Handbook of Avian Medicine (2nd ed.)*. (pp. 180-214). Oxford: Butterworth-Heinemann, pp. 456.
- Rehder, N. B., Bird, D. M., Lague, P. C., & Mackay, C. (1982). Variation in selected hematological parameters of captive red-tailed hawks. *Journal of wildlife diseases*, 18(1), 105-109.
- Richardson, D. J., & Nickol, B. B. (2008). Acanthocephala. In Atkinson, C. T., Thomas, N. J., & Hunter, D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 277-288). Iowa, USA: Wiley- Blackwell, pp. 592.
- Rosse, W. F., Waldmann, T. A. (1936). Factors Controlling Erythropoiesis in Birds. *Blood*, 27(5).
- Sacchi, L., & Prigioni, C. (1984). Occurrence of leucocytozoon and haemoproteus- (Apicomplexa, Haemosporina) in Falconiformes and Strigiformes of Italy. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 59(3), 219-226.
- Samour J. (2000). *Avian Medicine (2nd ed.)*. London: Mosby Elsevier.

- Samour, J. (2006). Diagnostic Value of Hematology. In Harrison, G. J. & Lightfoot, T. L. (Eds.), *Clinical Avian Medicine, Vol II* (pp. 587-609). Florida: Spix Publishing.
- Samour, J. (2015). *Avian medicine*. London.
- Sanmartin, M. L., Alvarez, A., Barreiro, G. & Leiro, J. (2004). Helminth fauna of falconiform and strigiform birds of prey in Galicia, northwest Spain. *Parasitology Research*, 92, 255–263.
- Santoro, M., Tripepi, M., Kinsella, J. M., Panebianco, A. & Mattiucci, S. (2010). Helminth infestation in birds of prey (Accipitriformes and Falconiformes) in Southern Italy. *The Veterinary Journal*, 186, 119–122.
- Santos, N.G., Pereira, M.C., Melo, P.M. & de Carvalho, L.M. (2008). Pesquisa de hemoprotozoários em aves de rapina (ordens Falconiformes e Strigiformes) em centros de recuperação em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103, 195-200.
- dos Santos Schmidt, E. M., Paulillo, A. C., Santin, E., Dittrich, R. L., & de Oliveira, E. G. (2007). Hematological and serum chemistry values for the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): variation with sex and age. *International Journal of Poultry Science*, 6(2), 137-139.
- Scanes, C. G. (Ed.). (2014). *Sturkie's avian physiology*. Elsevier.
- Seok, S. H., Jeong, D. H., Park, S. J., Lee, S. Y., Lee, H. C., & Yeon, S. C. (2017). Hematologic and plasma biochemical values of cinereous vulture (*Aegypius monachus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(2), 514-517.
- Sengul, E., Gelen, V., Kara, A., Simsek, N., Karadeniz, A., & Balkaya, H. (2015). Enzyme histochemical, histometric and hematological features of peripheral blood cells in Sparrowhawk *Accipiter nisus* (Falconiformes: Accipitridae). *Italian journal of zoology*, 82(2), 151-156.
- Smith, S. A. (1996). Parasites of Birds of Prey: Their Diagnosis and Treatment. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 5(2), 97-105.
- Snow, D. W., Perrins, C. M., & Gillmor, R. (1998). *The birds of the western palaearctic. Vol. I, Non-passerines*. Oxford University Press.
- Sturkie, P. D. (Ed.). (2012). *Avian physiology*. Springer Science & Business Media.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2007). *Veterinary Parasitology (3rd ed.)*. Blackwell Publishing.

- Tedjo, D. I., Jonkers, D. M., Savelkoul, P. H., Masclee, A. A., van Best, N., Pierik, M. J., & Penders, J. (2015). The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PloS one*, *10*(5), e0126685.
- Tella, J. L., Torre, I., & Sanchez, C. (1996). Habitat availability and roost-site selection by the Stone Curlew *Burhinus oedicephalus* in an arid cultivated landscape. Los Monegros, NE Spain.
- Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R., Beldomenico, P., Burthe, S., Paterson, S., & Begon, M. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*, *330*(6001), 243-246.
- Tezel, M., Girişgin, A. O., Birlik, S., Yildirimhan, H. S., & Şenlik, B. (2015). Helminths of the digestive tract in *Buteo buteo* (Falconiformes: Falconidae) in Bursa Province of Northwest Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, *39*, 323–327.
- Tomás, A.F.V. (2014). *Rastreio parasitológico em aves selvagens de zonas periurbanas do Litoral e Interior de Portugal*. Mestrado em Biologia Humana e do Ambiente. Lisboa: Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Animal. Universidade de Lisboa
- Tripathi, D. G., Desai, M. W., & Mesquita, A. M. (2001). Evaluation of a novel, two component, two step AFB cold staining method. *Indian journal of medical microbiology*, *19*(3), 163.
- Vadlejch, J., Petrtyl, M., Zaichenko, I., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., & Moravec, M. (2011). Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitology research*, *109*(5), 1387-1394.
- Viana, M.S.B. (2010). *Características hematológicas e ocorrência de hemoparasitas em aves de rapina*. Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
- Viana, M. B., de Carvalho, M., & González, F. G. (2010). *Valores hematológicos de um grupo de milhafres reais (Milvus Milvus) mantidos em cativeiro no GREFA*. Poster apresentado no Congresso de Animais Exóticos e de Zoo da AEFMV. Lisboa, Portugal.
- Villegas, A., Sanchez, J. M., Costillo, E., & Corbacho, C. (2002). Blood chemistry and haematocrit of the black vulture (*Aegypius monachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *132*(2), 489-497.
- Villegas, A., Guzman, J. S., Corbacho, C., Corbacho, P., & Vargas, J. M. (2004). Blood values of Bald Ibis (*Geronticus eremita*) in captivity: comparative ranges and variability with age, sex and physical condition. *Journal of Ornithology*, *145*(2), 98-104.

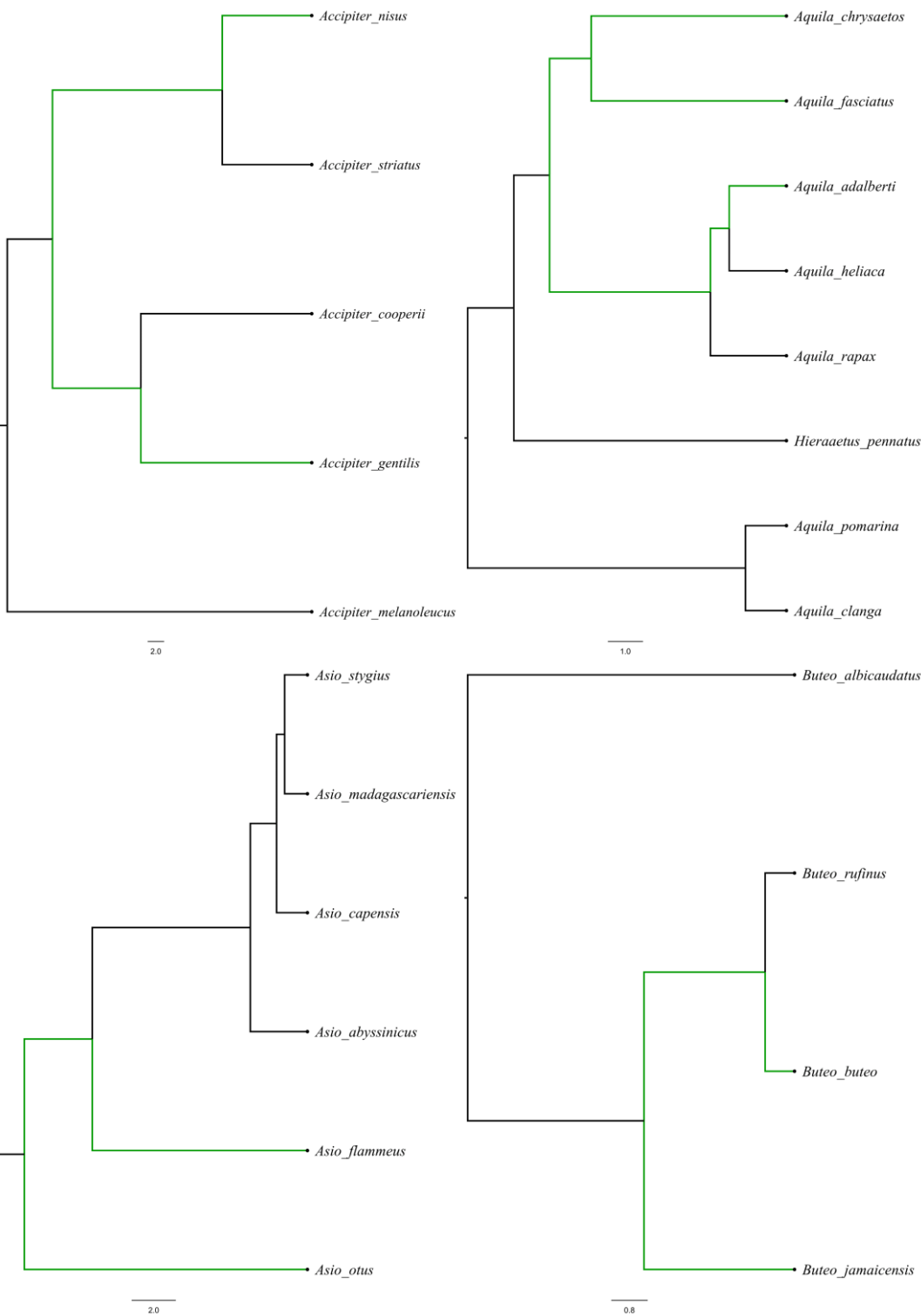
- Vleck, C. M., Vertalino, N., Vleck, D., & Bucher, T. L. (2000). Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins. *The condor*, 102(2), 392-400.
- Walberg, J. (2001, April). *White blood cell counting techniques in birds*. In *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* (Vol. 10). (pp. 72-76). WB Saunders.
- Yabsley, M. J. (2008). Capillariid Nematodes. In Atkinson, C. T., Thomas, N. J., & Hunter, D. B. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Birds*. (pp. 463-499). Iowa, USA: Wiley-Blackwell, pp. 592.
- Yamaguti, S. (1961). *Systema Helminthum Volume III: The Nematodes of Vertebrates*. London: Interscience Publishers Inc, pp. 1261.
- Zacarias, N.V.A. (2017). *Rastreio parasitológico em aves selvagens ingressadas no centro de recuperação e investigação de animais selvagens da Ria Formosa*. Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa
- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012b). *Veterinary Clinical Parasitology. Vasa* (8th ed.). Wiley-Blackwell.
- Zucca, P. & Delogu, M. (2007). Infectious diseases: Helminths. In Samour, J., *Avian Medicine*. (2nd ed.). (pp. 325-336). London: Mosby, pp. 540.
- Zucca, P., & Delogu, M. (2010). Enfermedades infecciosas y parasitarias. In Samour, J. (Ed.), *Medicina Aviária* (2nd Ed.). (pp. 309–392). Barcelona: Elsevier España.

Anexo I - Protocolo de sedimentação fecal com auxílio de centrífuga

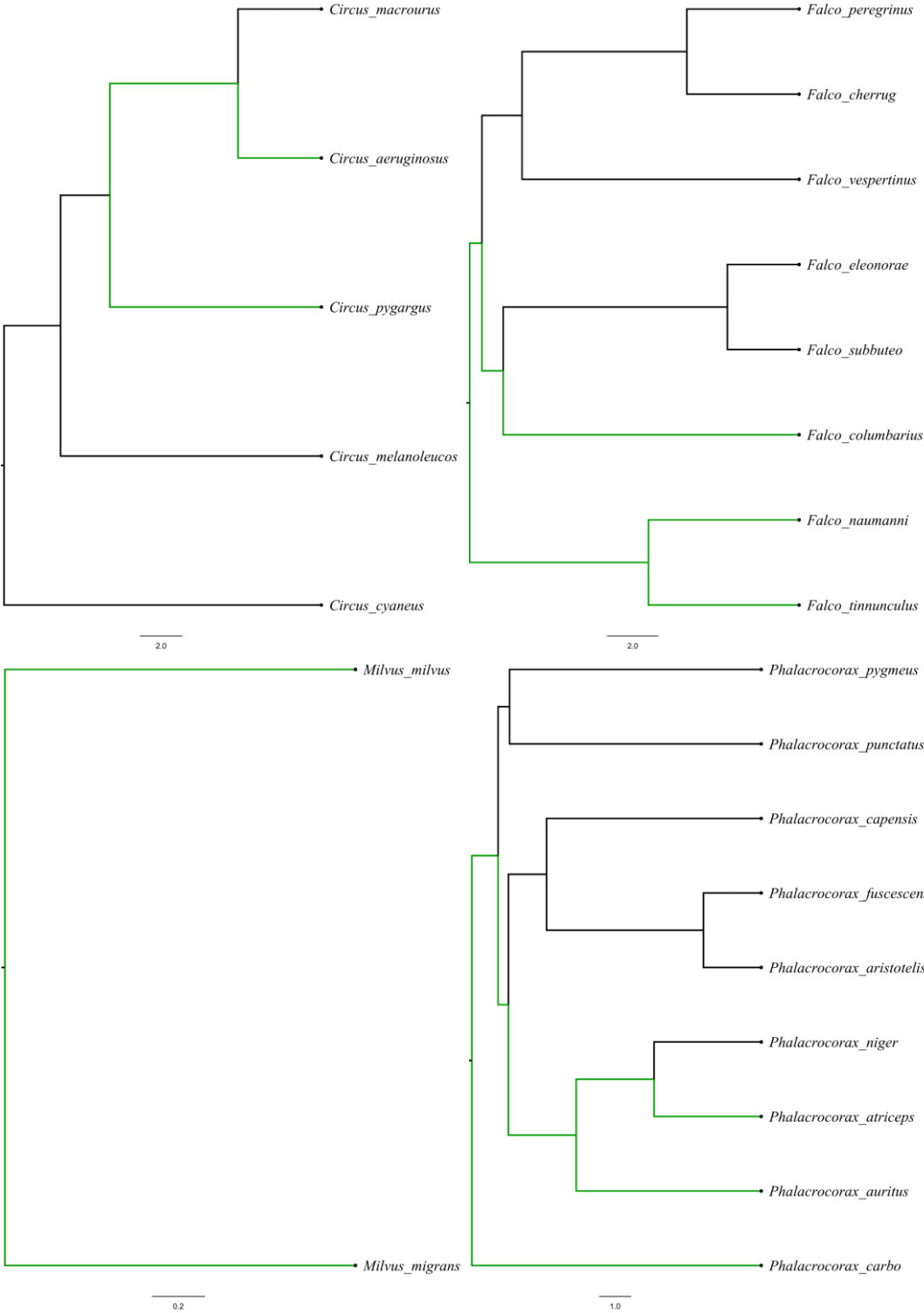
1. Retirar uma pequena quantidade de amostra fecal (do tamanho de uma ervilha) utilizando uma vareta;
2. Homogeneizar em 2 ml de solução saturada de sabão;
3. Filtrar através de duas camadas de gaze para dentro de um tubo de ensaio, utilizando um funil;
4. Adicionar 8 ml de solução saturada e homogeneizar;
5. Centrifugar a 2000g durante um minuto;
6. Retirar o sobrenadante e ressuspender amostra;
7. Repetir passos 4, 5 e 6 até o sobrenadante se apresentar transparente;
8. Descartar sobrenadante e suspender o depósito no menor volume possível de solução (< 1 ml);
9. Colocar uma gota numa lâmina e cobrir com lamela;
10. Observar ao microscópio óptico em ampliações crescentes, efetuando varrimento da lamela.

(adaptação da sedimentação simples descrita por Barger & MacNeill, 2015)

Anexo II - Árvores filogenéticas utilizadas na substituição de valores de referência hematológicos (adaptado de Jetz *et al.*, 2012).



Anexo II - Árvores filogenéticas utilizadas na substituição de valores de referência hematológicos
(adaptado de Jetz *et al.*, 2012) (cont.)



Anexo III – Valores de referência das linhas leucocitárias por espécie

		Eosinófilos Rel.					Eosinófilos Abs.					Heterófilos Rel.					Heterófilos Abs.					Linfócitos Rel.					Linfócitos Abs.					
Espécie	n	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Referência
A. monachus	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(Villegas et al., 2002)	
	31	1,70	4,80	1,90	8,70	%	0,36	0,94	0,41	1,98	x10 ⁹ /L	74,70	84,80	5,20	92,30	%	10,94	16,44	2,87	22,09	x10 ⁹ /L	4,00	9,60	3,90	19,70	%	0,55	1,87	0,80	3,57	x10 ⁹ /L	(Seok et al., 2017)
A. gentilis	43	-	-	-	-	-	0,00	-	-	0,65	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	3,50	-	-	6,97	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,38	-	-	1,93	x10 ⁹ /L	(Jennings, 1996)
A. nisus	9	-	5,22	0,50	-	%	-	-	-	-	-	-	49,44	2,75	-	%	-	-	-	-	-	-	40,33	1,50	-	%	-	-	-	-	-	(Sengul et al., 2015)
P. carbo	89	0,00	9,78	0,63	31,00	%	-	-	-	-	-	3,00	28,42	1,13	60,00	%	-	-	-	-	-	27,00	54,76	1,20	78,00	%	-	-	-	-	-	(Minias et al., 2013)
B. buteo	6	-	-	-	-	-	0,10	-	-	3,10	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	2,30	5,50	-	8,80	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,10	1,70	-	2,40	x10 ⁹ /L	(Hawkey & Samour, 1988)
	11	5,50	-	-	19,00	%	-	-	-	-	-	20,50	-	-	39,80	%	-	-	-	-	-	35,00	-	-	65,50	%	-	-	-	-	-	(Powers et al., 1994)
A. flammeus	18	5,00	13,00	8,00	33,00	%	0,30	1,20	0,80	2,70	x10 ⁹ /L	8,00	30,00	14,00	66,00	%	0,40	3,50	2,90	8,80	x10 ⁹ /L	14,00	47,00	15,00	70,00	%	0,90	5,00	3,40	12,50	x10 ⁹ /L	(Ammersbach, 2015)
T. alba	51	2,00	12,00	7,00	31,00	%	0,20	1,60	1,50	7,10	x10 ⁹ /L	26,00	56,00	15,00	82,00	%	2,50	6,90	2,80	15,40	x10 ⁹ /L	3,00	23,00	10,00	45,00	%	0,20	3,10	2,10	9,00	x10 ⁹ /L	(Ammersbach, 2015)
G. chloropus	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(Álvarez et al., 2005)	
F. columbarius	33	-	-	-	-	-	0,00	-	-	0,15	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	3,20	-	-	4,03	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,20	-	-	1,56	x10 ⁹ /L	(Jennings, 1996)
F. tinnunculus	16	0,00	0,00	0,00	0,00	%	-	-	-	-	-	42,00	49,80	1,03	55,00	%	-	-	-	-	-	35,00	43,80	5,44	56,00	%	-	-	-	-	-	(Shen et al., 2008)
B. oedicnemus	18	-	-	-	-	-	0,00	0,68	0,19	2,78	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	0,99	5,99	0,70	11,59	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	0,20	0,54	0,08	1,38	x10 ⁹ /L	(Samour et al., 1998)
S. aluco	14	-	-	-	-	-	0,00	-	-	1,90	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,10	3,40	2,00	7,20	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	0,90	3,30	1,40	5,10	x10 ⁹ /L	(Hawkey & Samour, 1988)

Legenda. Rel. – Valores relativos; Abs. – Valores absolutos; n – Dimensão da amostra; Min. – Mínimo; Méd. – Média; DP – Desvio padrão; Max. – Máximo; Un. – Unidade.

Anexo III – Valores de referência das linhas leucocitárias por espécie (cont.)

Espécie	n	Eosinófilos Rel.					Eosinófilos Abs.					Heterófilos Rel.					Heterófilos Abs.					Linfócitos Rel.					Linfócitos Abs.					Referência
		Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	
<i>C. aeruginosus</i>	4	-	4,00	2,64	-	%	-	-	-	-	-	-	84,33	4,72	-	%	-	-	-	-	-	-	12,00	5,29	-	%	-	-	-	-	-	(Lavin et al., 1992)
	3	1,50	-	-	6,50	%	-	-	-	-	-	26,50	-	-	39,50	%	-	-	-	-	-	48,00	-	-	59,50	%	-	-	-	-	-	(Powers et al., 1994)
<i>F. naumanni</i>	15	0,00	1,20	0,80	2,00	%	-	-	-	-	-	41,00	46,60	4,80	53,00	%	-	-	-	-	-	42,00	48,80	5,20	56,00	%	-	-	-	-	-	(Montijano et al., 2004)
<i>B. bubo</i>	23	5,00	16,00	10,00	47,00	%	0,60	4,00	5,90	21,90	x10 ⁹ /L	31,00	51,00	12,00	69,00	%	2,80	10,90	8,30	33,60	x10 ⁹ /L	6,00	23,00	11,00	47,00	%	1,70	4,00	2,10	10,40	x10 ⁹ /L	(Ammersbach, 2015)
<i>G. fulvus</i>	12	0,00	0,86	1,57	4,00	%	0,00	0,51	1,19	3,20	x10 ⁹ /L	51,00	57,83	9,87	72,00	%	1,95	7,04	5,02	16,56	x10 ⁹ /L	24,00	40,67	10,52	49,00	%	1,92	5,02	2,70	9,00	x10 ⁹ /L	(Polo et al., 1992)
<i>A. adalberti</i>	12	3,00	8,50	4,68	16,00	%	0,50	1,30	0,74	2,70	x10 ⁹ /L	41,00	51,50	6,68	66,00	%	6,10	8,00	1,79	11,30	x10 ⁹ /L	26,00	35,50	7,61	48,00	%	3,30	5,50	1,66	9,20	x10 ⁹ /L	(García-Montijano, 2002)
<i>A. chrysaetus</i>	5	1,00	2,33	1,15	3,00	%	0,06	0,17	0,10	0,26	x10 ⁹ /L	49,00	58,83	9,75	68,50	%	2,88	3,87	1,98	5,99	x10 ⁹ /L	27,50	34,17	5,80	38,00	%	2,22	2,29	0,11	2,41	x10 ⁹ /L	(Polo et al., 1992)
<i>M. milvus</i>	9	3,00	12,00	-	23,00	%	0,40	1,16	0,65	2,37	x10 ⁹ /L	53,00	68,00	-	89,00	%	3,38	7,72	3,80	13,12	x10 ⁹ /L	5,00	23,00	-	13,00	%	0,53	1,34	0,67	2,24	x10 ⁹ /L	(Viana et al., 2010)
<i>C. pygargus</i>	14	-	-	-	-	-	0,33	3,63	2,59	7,99	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	0,56	7,09	4,34	16,32	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	4,90	11,41	3,73	19,20	x10 ⁹ /L	(Liminana et al., 2009)
<i>P. atriceps</i>	106	-	-	-	-	-	0,00	0,83	0,72	4,30	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,20	4,64	1,09	7,10	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,80	4,16	1,19	7,20	x10 ⁹ /L	(Gallo et al., 2013)
<i>F. peregrinus</i>	70	-	-	-	-	-	0,00	-	-	0,30	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,40	-	-	8,55	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	1,10	-	-	3,30	x10 ⁹ /L	(Parga et al., 2001)
<i>B. jamaicensis</i>	71	-	-	-	-	-	0,00	1,96	1,69	8,69	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	3,67	10,81	4,82	25,40	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	0,56	5,16	2,98	13,34	x10 ⁹ /L	(Black et al., 2011)
<i>P. auritus</i>	18	3,00	11,00	7,00	27,00	%	0,60	3,20	2,90	12,10	x10 ⁹ /L	34,00	50,00	10,00	77,00	%	4,10	14,50	5,90	24,80	x10 ⁹ /L	17,00	36,00	13,00	59,00	%	3,20	9,60	3,40	16,80	x10 ⁹ /L	(Kuiken & Danesik, 1999)

Legenda. Rel. – Valores relativos; Abs. – Valores absolutos; n – Dimensão da amostra; Min. – Mínimo; Méd. – Média; DP – Desvio padrão; Max. – Máximo; Un. – Unidade.

Anexo IV – Valores de referência de hematócrito, hemácias, leucócitos e rácio H/L por espécie (HCT – Hematócrito; RBCC – Contagem de hemácias; WBCC – Contagem de leucócitos; H/L – Rácio H/L; n – Dimensão da amostra; Min. – Mínimo; Méd. – Média; DP – Desvio padrão; Max. – Máximo; Un. – Unidade).

Espécie	n	HCT					RBCC					WBCC					H/L				Referência
		Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	Un.	Min.	Méd.	DP	Max.	
<i>A. monachus</i>	5	0,294	0,39	0,07	0,46	L/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(Villegas <i>et al.</i> , 2002)
	31	-	-	-	-	-	2,02	2,39	0,17	2,72	x10 ¹² /L	11,90	19,26	3,09	24,80	x10 ⁹ /L	3,85	10,45	4,57	22,69	(Seok <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. gentilis</i>	43	0,43	-	-	0,53	L/L	2,60	-	-	3,48	x10 ¹² /L	4,00	-	-	11,00	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Jennings, 1996)
<i>A. nisus</i>	9	-	0,41	0,04	-	L/L	-	3,40	0,62	-	x10 ¹² /L	-	9,16	1,85	-	x10 ⁹ /L	-	1,23	0,70	-	(Sengul <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. carbo</i>	89	0,24	0,33	0,01	0,48	L/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	0,58	0,04	2,22	(Minias <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. buteo</i>	6	0,34	0,38	-	0,42	L/L	2,20	2,40	-	2,70	x10 ¹² /L	4,60	9,10	-	13,90	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Hawkey & Samour, 1988)
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,00	-	-	49,00	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Powers <i>et al.</i> , 1994)
<i>A. flammeus</i>	18	0,40	0,48	0,06	0,64	L/L	1,80	2,60	0,60	4,20	x10 ¹² /L	1,50	6,00	3,60	15,20	x10 ⁹ /L	0,10	0,90	1,00	4,70	(Ammersbach, 2015)
<i>T. alba</i>	51	0,41	0,48	0,04	0,57	L/L	0,90	2,40	0,40	3,30	x10 ¹² /L	2,40	8,30	5,00	29,00	x10 ⁹ /L	0,60	3,80	4,50	27,30	(Ammersbach, 2015)
<i>G. chloropus</i>	30	-	0,44	0,04	-	L/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,72	0,35	-	(Álvarez <i>et al.</i> , 2005)
<i>F. columbarius</i>	33	0,39	-	-	0,51	L/L	2,85	-	-	4,10	x10 ¹² /L	4,00	-	-	9,50	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Jennings, 1996)
<i>F. tinnunculus</i>	16	0,32	0,40	0,04	0,46	L/L	1,52	2,47	0,55	2,92	x10 ¹² /L	4,25	6,02	1,42	9,75	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Shen <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. oediconemus</i>	18	0,44	0,47	0,70	0,58	L/L	2,59	2,86	0,04	3,27	x10 ¹² /L	2,45	7,88	0,66	12,60	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Samour <i>et al.</i> , 1998)
<i>S. aluco</i>	14	0,36	0,40	0,03	0,47	L/L	2,00	2,50	0,20	2,90	x10 ¹² /L	2,40	6,70	3,30	11,80	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Hawkey & Samour, 1988)
<i>C. aeruginosus</i>	4	-	0,49	0,05	-	L/L	-	2,69	0,50	-	x10 ¹² /L	-	16,93	7,91	-	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Lavin <i>et al.</i> , 1992)
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x10 ¹² /L	9,00	-	-	33,00	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Powers <i>et al.</i> , 1994)
<i>F. naumanni</i>	15	0,38	0,44	0,04	0,49	L/L	2,15	3,04	0,47	3,84	x10 ¹² /L	8,40	16,02	9,26	38,88	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Montijano <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. bubo</i>	23	0,33	0,50	0,09	0,64	L/L	1,50	2,00	0,30	2,80	x10 ¹² /L	2,90	17,20	11,60	45,10	x10 ⁹ /L	0,70	2,90	1,90	6,80	(Ammersbach, 2015)
<i>G. fulvus</i>	12	0,40	0,46	0,03	0,52	L/L	2,19	2,63	0,32	2,87	x10 ¹² /L	5,00	13,19	7,32	24,00	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Polo <i>et al.</i> , 1992)
<i>A. adalberti</i>	12	0,39	0,43	0,03	0,46	L/L	1,93	2,19	0,16	2,45	x10 ¹² /L	11,70	15,40	2,58	19,20	x10 ⁹ /L	0,98	1,52	0,49	2,54	(García-Montijano, 2002)
<i>A. chrysaetus</i>	5	0,38	0,42	0,04	0,46	L/L	1,96	2,56	0,54	3,22	x10 ¹² /L	5,87	12,32	7,95	24,00	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Polo <i>et al.</i> , 1992)
<i>M. milvus</i>	9	0,28	0,41	0,06	0,48	L/L	1,50	2,19	0,44	2,93	x10 ¹² /L	6,38	10,97	4,16	16,94	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Viana <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. pygargus</i>	14	0,26	0,33	0,04	0,45	L/L	1,44	2,05	0,30	2,58	x10 ¹² /L	6,20	22,69	9,64	38,40	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Liminana <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. atriceps</i>	106	0,44	0,50	0,02	0,54	L/L	0,40	3,73	1,15	6,33	x10 ¹² /L	2,38	12,08	4,95	24,01	x10 ⁹ /L	0,11	1,20	0,65	3,40	(Gallo <i>et al.</i> , 2013)
<i>F. peregrinus</i>	70	0,37	-	-	0,53	L/L	2,95	-	-	3,94	x10 ¹² /L	3,30	-	-	11,00	x10 ⁹ /L	-	-	-	-	(Parga <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. jamaicensis</i>	71	0,24	0,37	0,05	0,50	L/L	-	-	-	-	-	5,60	19,28	7,51	36,90	x10 ⁹ /L	0,66	3,50	5,34	41,50	(Black <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. auritus</i>	18	0,26	0,31	0,03	0,36	L/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(Kuiken & Danesik, 1999)

Anexo V – Dados utilizados na análise (Características dos indivíduos, análises parasitológicas e hematócrito).

Espécie	Hist.	Grupo	Estado	Causa	Parasit.	Local.	Ag. GI 1	OPG 1	Par. Mult.	Ag. GI 2	OPG 2	Ag. H	P/L	HCT	Aval.
<i>A. monachus</i>	15/0053	Necro	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,38	N
<i>A. gentilis</i>	15/0034	Aves	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,5	N
<i>A. monachus</i>	15/0054	Necro	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,44	N
<i>A. nisus</i>	15/0045	Aves	Selvagem	Trauma	S	A	Capillaria sp.	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Leucocytozoon sp.	1x10 ⁹ /L	0,23	Low
<i>A. monachus</i>	15/0055	Necro	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.	0,42	N
<i>A. fasciata</i>	15/0067	Aves	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.
<i>A. fasciata</i>	15/0068	Aves	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.
<i>P. carbo</i>	15/0057	Aqua	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	13600	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,34	N
<i>B. buteo</i>	15/0076	PMT	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	2400	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,46	High
<i>A. flammeus</i>	15/0097	Noct	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	760	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,46	N
<i>T. alba</i>	14/4144	Noct	Selvagem	Trauma	S	GI	Sarcocystis sp.	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,55	N
<i>P. carbo</i>	15/0106	Aqua	Selvagem	Trauma	S	GI	Oocistos de coccídeo	3666	Positivo	Capillaria sp.	1000	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>G. chloropus</i>	15/0140	Aqua	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	<200	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,47	n.a.
<i>A. otus</i>	15/0139	Noct	Selvagem	Trauma	S	A	Sarcocystis sp.	800	Negativo	Negativo	n.a.	Leucocytozoon sp.	5,06x10 ⁹ /L	0,3	Low
<i>F. columbarius</i>	15/0132	PMT	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	n.a.	Negativo	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>T. alba</i>	15/0143	Noct	Selvagem	Debilidade	N	N	Negativo	<200	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,33	Low
<i>F. tinnunculus</i>	15/0170	PMT	Selvagem	Trauma	S	GI	Sarcocystis sp.	<200	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,42	N
<i>M. migrans</i>	15/0189	Necro	Selvagem	Trauma	N	N	Negativo	200	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,42	N
<i>B. buteo</i>	15/0193	PMT	Selvagem	Debilidade	S	A	Capillaria sp.	100	Negativo	Negativo	n.a.	Leucocytozoon sp.	2,8x10 ⁹ /L	0,4	N
<i>B. oedignemus</i>	15/0231	Estep	Selvagem	Trauma	S	GI	Céstode	7300	Positivo	Capillaria sp.	9500	Negativo	n.a.	0,37	Low
<i>T. alba</i>	15/0233	Noct	Selvagem	Trauma	N	N	Negativo	<200	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,41	N
<i>S. aluco</i>	15/0264	Noct	Selvagem	Trauma	S	A	Capillaria sp.	2600	Negativo	Negativo	n.a.	Leucocytozoon sp.	0,8x10 ⁹ /L	0,34	N
<i>A. fasciata</i>	15/0339	Aves	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	<100	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,3	Low
<i>A. fasciata</i>	15/0340	Aves	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	<100	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,36	N
<i>C. aeruginosus</i>	15/0353	Aves	Selvagem	Intoxicação	S	A	Capillaria sp.	<200	Negativo	Negativo	n.a.	Plasmodium sp.	0,01x10 ¹² /L	0,39	N
<i>F. tinnunculus</i>	15/0374	PMT	Selvagem	Debilidade	S	GI	Capillaria sp.	4000	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.
<i>F. naumanni</i>	15/0369	PMT	Cativeiro	Cativeiro	N	N	Negativo	<200	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,42	N
<i>A. otus</i>	15/0352	Noct	Selvagem	Trauma	S	A	Céstode	<200	Positivo	Sinymanthus sp.	n.a.	Leucocytozoon sp.	2,2x10 ⁹ /L	0,32	Low

Legenda. Hist. – N.º de historial do indivíduo; Parasit. – Existência de parasitose (Sim/Não); Local. - Localização da parasitose (Gastrointestinal/Hemática/Ambas/Nenhuma); Ag. GI 1 – Primeiro parasita gastrointestinal; OPG 1- Ovos por grama de fezes do primeiro parasita; Par. Mult. – Parasitose múltipla; Ag. GI 2 – Segundo parasita gastrointestinal; OPG 2 – ovos por grama de fezes do segundo parasita; Ag. H – Parasita hemático; P/L – formas parasitárias por litro de sangue; HCT – Hematócrito; Aval. – Avaliação clínica.

Anexo V – Dados utilizados na análise (Características dos indivíduos, análises parasitológicas e hematócrito) (cont.).

Espécie	Hist.	Grupo	Estado	Causa	Parasit.	Local.	Ag. GI 1	OPG 1	Par. Mult.	Ag. GI 2	OPG 2	Ag. H	P/L	HCT	Aval.
<i>B. bubo</i>	15/0384	Noct	Selvagem	Cria	N	N	Céstode	<100	Negativo	Negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>F. tinnunculus</i>	15/0390	PMT	Selvagem	Debilidade	S	H	Negativo	<100	Negativo	Negativo	n.a.	Plasmodium sp.	0,59 x10 ¹² /L	0,35	N
<i>G. fulvus</i>	15/0482	Necro	Selvagem	Trauma	N	N	Negativo	<100	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,43	N
<i>M. migrans</i>	15/0506	Necro	Selvagem	Debilidade	S	GI	Capillaria sp.	<100	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,38	N
<i>A. gentilis</i>	15/0424	Aves	Selvagem	Trauma	S	GI	Capillaria sp.	2000	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,52	N
<i>B. bubo</i>	15/0564	Noct	Selvagem	Cria	N	N	Negativo	<100	Negativo	Negativo	n.a.	Negativo	n.a.	0,33	N

Legenda. Hist. – N.º de historial do indivíduo; Parasit. – Existência de parasitose (Sim/Não); Local. - Localização da parasitose (Gastrointestinal/Hemática/Ambas/Nenhuma); Ag. GI 1 – Primeiro parasita gastrointestinal; OPG 1- Ovos por grama de fezes do primeiro parasita; Par. Mult. – Parasitose múltipla; Ag. GI 2 – Segundo parasita gastrointestinal; OPG 2 – ovos por grama de fezes do segundo parasita; Ag. H – Parasita hemático; P/L – formas parasitárias por litro de sangue; HCT – Hematócrito; Aval. – Avaliação clínica.

Anexo VI – Dados utilizados na análise (Análises hematológicas).

Espécie	Nº Hist.	RBCC x10 ¹² /L	Aval.	WBCC x10 ⁹ /L	Aval.	Eos Rel.	Aval.	Eos. Abs.	Aval.	Het. Rel.	Aval.	Het. Abs.	Aval.	Linf. Rel.	Aval.	Linf. Abs.	Aval.	H/L	Aval.
<i>A. monachus</i>	15/0053	2,13	N	20,9	N	2%	N	0,418	N	78%	N	16,302	N	14%	N	2,926	N	5,57	N
<i>A. gentilis</i>	15/0034	n.a.	n.a.	44,75	High	13%	High	5,8175	High	46%	N	n.a.	n.a.	27%	Low	n.a.	n.a.	1,7	High
<i>A. monachus</i>	15/0054	1,6	Low	16,72	N	2%	N	0,3344	Low	77%	N	12,8744	N	19%	N	3,1768	N	4,05	N
<i>A. nisus</i>	15/0045	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>A. monachus</i>	15/0055	1,6	Low	17,82	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>A. fasciata</i>	15/0067	2,44	N	8,67	N	1%	N	0,0867	N	70%	High	6,069	High	21%	Low	1,8207	Low	3,33	High
<i>A. fasciata</i>	15/0068	2,59	N	6,44	N	5%	High	0,322	High	42%	Low	2,7048	Low	34%	N	2,1896	Low	1,24	N
<i>P. carbo</i>	15/0057	n.a.	n.a.	19,78	N	6%	N	1,1868	N	86%	High	17,0108	High	4%	Low	0,7912	Low	21,5	High
<i>B. buteo</i>	15/0076	2,03	N	11,66	N	15%	N	1,7	N	55%	High	6,4	N	20%	Low	2,3	N	2,75	N
<i>A. flammeus</i>	15/0097	2,16	N	44	High	15%	N	6,6	High	55%	N	24,2	High	23%	High	10,12	N	2,39	N
<i>T. alba</i>	14/4144	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6%	N	n.a.	n.a.	36%	N	n.a.	n.a.	52%	High	n.a.	n.a.	0,69	N
<i>P. carbo</i>	15/0106	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>G. chloropus</i>	15/0140	3,59	n.a.	16,5	n.a.	7%	n.a.	1,155	n.a.	79%	n.a.	13,035	n.a.	6%	n.a.	0,99	n.a.	3,17	N
<i>A. otus</i>	15/0139	3,1	N	20,24	High	6%	N	1,21	N	70%	High	14,168	High	13%	Low	2,6312	N	5,38	High
<i>F. columbarius</i>	15/0132	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Legenda. Hist. – N.º de historial do indivíduo; RBCC – Contagem de hemácias; WBCC – Contagem de leucócitos; Eos. Rel. – Valores relativos de eosinófilos; Eos. Abs. – Valores absolutos de eosinófilos; Het. Rel. – Valores relativos de heterófilos; Het. Abs. – Valores absolutos de heterófilos; Linf. Rel. – Valores relativos de linfócitos; Linf. Abs. – Valores absolutos de linfócitos; Aval. – Avaliação clínica; H/L – Rácio H/L.

Anexo VI – Dados utilizados na análise (Análises hematológicas) (cont.).

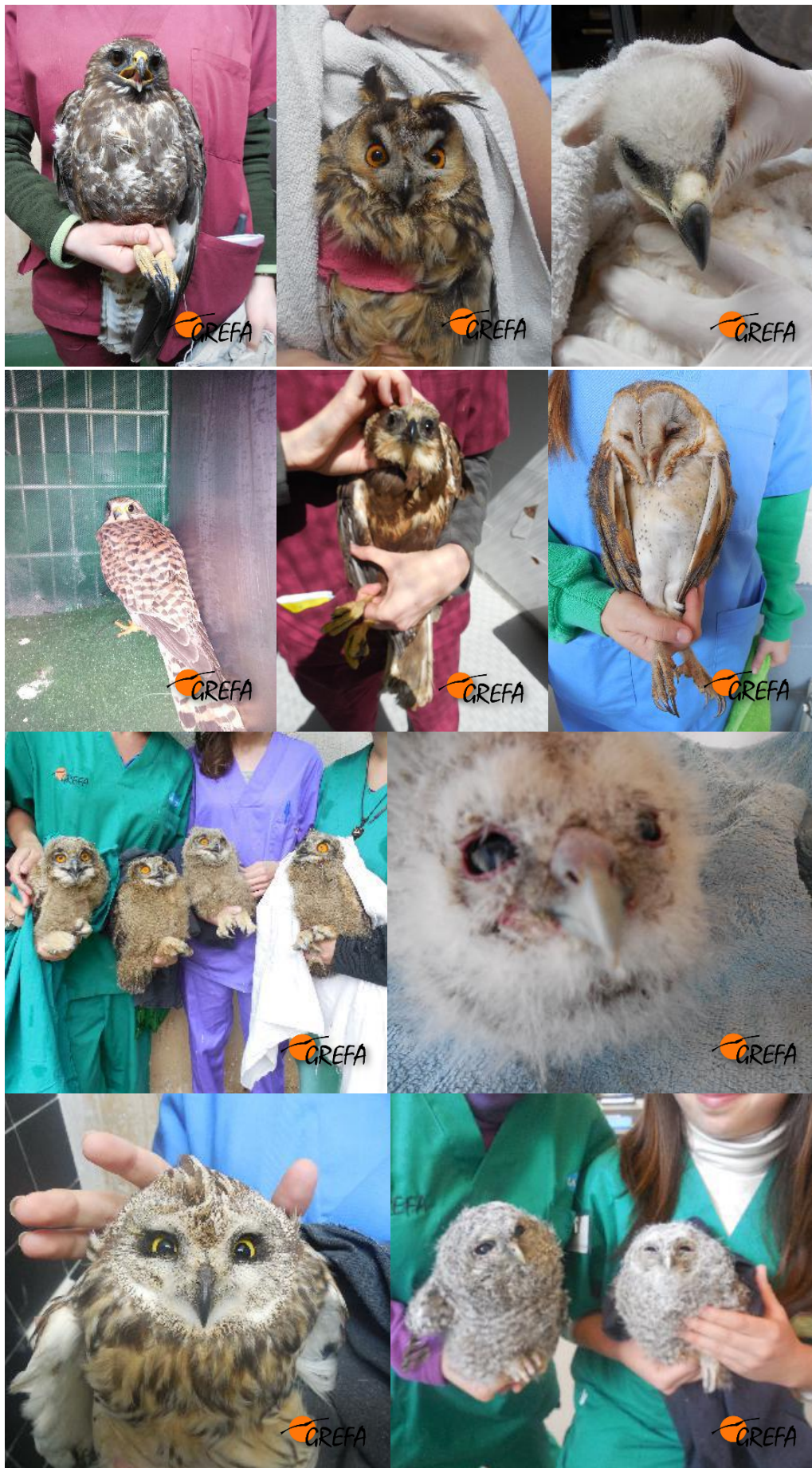
Espécie	Nº Hist.	RBCC x10 ¹² /L	Aval.	WBCC x10 ⁹ /L	Aval.	Eos Rel.	Aval.	Eos. Abs.	Aval.	Het. Rel.	Aval.	Het. Abs.	Aval.	Linf. Rel.	Aval.	Linf. Abs.	Aval.	H/L	Aval.
<i>T. alba</i>	15/0143	1,74	N	92,4	High	8%	N	7,392	High	64%	N	59,136	High	22%	N	20,328	High	2,91	N
<i>F. tinnunculus</i>	15/0170	2,06	N	4,62	N	3%	High	0,14	N	78%	High	3,60	N	18%	Low	0,83	Low	4,33	N
<i>M. migrans</i>	15/0189	2,22	N	14,96	N	6%	N	0,8976	N	63%	N	9,4248	N	24%	High	3,5904	High	2,63	n.a.
<i>B. buteo</i>	15/0193	2,15	N	23,76	High	6%	N	1,43	N	85%	High	20,2	High	3%	Low	0,71	Low	28,33	N
<i>B. oedictnemus</i>	15/0231	2,43	Low	22,88	High	6%	n.a.	1,37	N	80%	n.a.	18,30	High	6%	n.a.	1,37	N	13,33	High
<i>T. alba</i>	15/0233	2,57	N	15,4	N	30%	N	4,62	N	25%	Low	3,85	N	32%	N	4,928	N	0,78	N
<i>S. aluco</i>	15/0264	1,35	Low	3,14	Low	22%	N	0,69	N	30%	N	0,942	Low	40%	N	1,256	Low	0,75	N
<i>A. fasciata</i>	15/0339	2,09	N	22	N	8%	High	1,76	High	54%	N	11,88	High	32%	N	7,04	High	1,69	N
<i>A. fasciata</i>	15/0340	1,69	Low	17,16	N	15%	High	2,574	High	52%	N	8,9232	High	28%	N	4,8048	High	1,86	N
<i>C. aeruginosus</i>	15/0353	1,99	N	10,89	N	1%	Low	0,11	Low	89%	High	9,69	N	8%	Low	0,87	Low	11,13	n.a.
<i>F. tinnunculus</i>	15/0374	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>F. naumanni</i>	15/0369	3,25	N	3,08	Low	7%	High	0,22	N	47%	N	1,45	Low	34%	Low	1,05	Low	1,38	N
<i>A. otus</i>	15/0352	2,2	N	10,84	N	18%	N	1,95	N	54%	N	5,8536	N	12%	Low	1,3008	N	4,5	N
<i>B. bubo</i>	15/0384	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>F. tinnunculus</i>	15/0390	2,31	N	14,52	High	8%	High	1,16	High	36%	Low	5,23	High	38%	N	5,52	High	0,95	N
<i>G. fulvus</i>	15/0482	2,3	N	30,14	high	2%	N	0,60	N	87%	High	26,22	High	1%	Low	0,3014	Low	87	High*
<i>M. migrans</i>	15/0506	2,38	N	37,51	High	0%	Low	0	Low	98%	High	36,7598	High	2%	Low	0,7502	N	49	n.a.
<i>A. gentilis</i>	15/0424	1,72	Low	11,33	N	9%	High	1,0197	High	67%	High	7,5911	High	7%	Low	0,7931	Low	9,57	High
<i>B. bubo</i>	15/0564	1,02	Low	11,88	N	48%	High	5,70	N	48%	N	5,70	N	42%	N	4,99	N	1,14	N

Legenda. Hist. – N.º de historial do indivíduo; RBCC – Contagem de hemácias; WBCC – Contagem de leucócitos; Eos. Rel. – Valores relativos de eosinófilos; Eos. Abs. – Valores absolutos de eosinófilos; Het. Rel. – Valores relativos de heterófilos; Het. Abs. – Valores absolutos de heterófilos; Linf. Rel. – Valores relativos de linfócitos; Linf. Abs. – Valores absolutos de linfócitos; Aval. – Avaliação clínica; H/L – Rácio H/L.

Anexo VII – Valores de referência para o rácio H/L por Ordem (Clark, 2015)

Ordem	Mínimo	Máximo
Falconiformes	0,26	37,4
Galliformes	0,19	9,83
Pelecaniformes	1,88	20,3
Strigiformes	0,52	13,3
Gruiformes	1,95	23,6
Charadriiformes	5,38	10,7

Anexo VIII – Alguns indivíduos amostrados (de cima para baixo e esquerda para a direita: *B. buteo*, *A. otus*, *A. fasciata*, *F. tinnunculus*, *C. aeruginosus*, *T. alba*, *B. bubo*, *S. aluco*, *A. flammeus*, *S. aluco*).



Anexo IX – Protocolo de colheita de amostras para este estudo, no GREFA.



PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA PARA EL TRABAJO DE FINAL DE CARRERA DE SUSANA

Objetivo del trabajo: valorar la relación entre el estrés de la, las cargas parasitarias y los valores hematológicos de las rapaces muestreados.

Especies de las que coger muestra: **todas las rapaces**, y aves de especies importantes (ej.: avutardas).

Momentos de toma de muestra:

A. **Protocolo de toma de muestra para el día de ingreso.** Si permanece hospitalizado la toma de muestras de parasitología se hará durante tres días seguidos y una única toma de muestras de hematología.

0. Si hay que tomar hisopo de microbiología para otros trabajos, hacer ahora.

1. **Valorar el estado del paciente**, y si tolera la manipulación necesaria para coger la muestra de sangre. Si no, valorar tomar muestra en la primera semana.
2. Coger **muestra de sangre** para:
 - a. 1 hematocrito;
 - b. 1 frotis;
 - c. 0,25 ml de sangre en EDTA.
3. Coger **heces de la muda/caja/jaula**, si las hay. Si no, hacer un **enema cloacal a partir del segundo día (sólo en caso de que el paciente lo tolere y que no esté hipotérmico)**:
 - a. Rellenar una jeringa del tamaño adecuado con suero fisiológico atemperado (de la estufa).
 - b. Aplicarlo en el interior de la cloaca y colocar un bote de recogida de muestras de parásitos (no hace falta que sea estéril) en la apertura para recoger el líquido del lavado (presionar la zona para que el líquido vaya saliendo, con cuidado).

B. **Salida de enfermería para rehabilitación:** una única muestra de heces y otra de hematología. **(Comprobar que está tomada la muestra antes de pasar a rehabilitación.)**

C. **Antes de la liberación:** sólo se tomarán heces si está en jaula interior y se tomará sangre unos días antes a la liberación o el mismo día sino es posible antes.

Conservación de las muestras:

- En la nevera del laboratorio pequeño (en el primer estante de la nevera, hay una caja etiquetada para las coprologías, otra caja para los frotis y espacio para los tubos de sangre de EDTA).
- Recordar etiquetar todo y abrir fichas correspondientes de Hematología y Parasitología.
 - o Apuntar en Observaciones: “Análisis realizado para el estudio de Susana”,
 - o Apuntar en la esquina superior derecha: “Para Susana”.

Necrópsias:

1. En caso de muerte del animal que haya formado parte de este estudio y que muera durante su estancia en GREFA se hará la necropsia completa, pero fijándonos especialmente en tomar muestras del tracto gastrointestinal y adrenales para anatomía patológica (en formol a 4%) en tubos de coprología (abrir la ficha correspondiente y llevar al laboratorio pequeño, ver conservación de muestras).

¡MUCHAS GRACIAS POR LA AYUDA!

Susana Mendes